

**Untersuchungen zum Einfluss von RhoA und der RhoA
Effektorkinase PKN auf die TNF-induzierte
Barrieredysfunktion in humanen intestinalen Epithelzellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe Markus Gluth

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Andreas Hermann

Gutachter: 1. Prof. Dr. Wolfgang Uckert
2. Prof. Dr. Franz Theuring
3. Prof. Dr. Daniel C. Baumgart

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2012

Zusammenfassung

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen stellen eine Gruppe von chronischen, häufig in Schüben verlaufenden Erkrankungen mit rezidivierenden Entzündungen des Gastrointestinaltraktes dar. Sie sind Ursache einer erheblichen Morbidität und mit hohen Kosten für das Gesundheitssystem verbunden. Es konnte gezeigt werden, dass eine gestörte Barrierefunktion einen wichtigen Schritt für die Pathogenese dieser Erkrankungen darstellt und dass das Zytokin Tumornekrosefaktor α (TNF) eine entscheidende Rolle dabei spielt. Obwohl für die kleine GTPase RhoA gezeigt werden konnte, dass sie in die Regulation der *tight junction* Funktion involviert ist, ist die Rolle bei der TNF-induzierten Barrieredysfunktion aufgrund der Komplexität der Signalwege nicht vollständig verstanden. Daher sollte der Einfluss von RhoA und der RhoA Effektorkinase PKN auf die TNF-induzierte Barrieredysfunktion mit geeigneten Modellsystemen *in vitro* untersucht werden.

Für eine genauere Charakterisierung der beteiligten Moleküle wurde ein induzierbares Expressionssystem etabliert, bei der die Expression einer konstitutiv aktiven (KA) RhoA- und PKN-Mutante sowie einer dominant negativen (DN) PKN-Mutante mit Hilfe von Doxzyklin kontrolliert werden konnte. Eine kontinuierliche Expression von KA RhoA hatte keine Auswirkungen auf die Differenzierungsprozesse in Caco-2 Zellen, jedoch führte die Induktion der Expression nach Abschluss der Differenzierungsphase zu einer Beeinträchtigung der epithelialen Barriere. Eine simultane Interferon- γ - und TNF-Behandlung resultierte ebenfalls in einer gestörten Barrierefunktion, welche allerdings in KA RhoA Zellen weniger stark ausgeprägt war. Da die TNF-Behandlung zu einer Aktivierung der RhoA Effektorkinase PKN führte, stellt dieses Protein ein Kandidatenmolekül für die Vermittlung dieser Effekte dar. Inhibition von PKN mit Hilfe von Bisindolylmaleimid I, Ro-31-8220, dem spezifischen Inhibitorpeptid PRL oder der Expression der DN Mutante führten zu einer Aggravierung der TNF-induzierten Barrieredysfunktion, welche durch eine Verringerung des transepithelialen elektrischen Widerstandes und eine erhöhte Permeabilität für Moleküle mit einer Größe von 3,78 bis 7,29 Ångström charakterisiert war. Diese Veränderungen wurden von einer Erhöhung des Myosin Leichtketten (MLC)- und NF- κ B p65-Phosphorylierungsniveaus sowie von morphologischen Veränderungen der *tight junction* Architektur begleitet. Im Gegensatz dazu konnte durch die Expression der KA PKN Variante der Abfall des epithelialen Widerstandes, die Erhöhung der Ionenpermeabilität, die vermehrte MLC- und NF- κ B p65-Phosphorylierung und die Veränderung der Zellmorphologie nach TNF-Behandlung abgeschwächt beziehungsweise verhindert werden.

Diese Ergebnisse liefern Hinweise auf eine potenzielle Rolle der RhoA Effektorkinase PKN bei der Modulation der TNF-induzierten Barrieredysfunktion in intestinalen Epithelzellen. Betrachtet man die Bedeutung einer gestörten Barrierefunktion für die Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, so könnte PKN ein neues potenzielles Ziel bei Entwicklung von zukünftigen Interventionsstrategien darstellen.

Schlagwörter:

TNF-alpha, RhoA, PKN, PKN1, tight junction, Barrieredysfunktion

Abstract

Inflammatory bowel diseases are relapsing systemic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract associated with high morbidity and costs. A plethora of studies demonstrated that impaired intestinal barrier function is a key step in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases and that the cytokine tumor necrosis factor α (TNF) is of pivotal importance for this effect. Although the small GTPase RhoA has been implicated in the control of tight junction function, its role in TNF induced barrier dysfunction is not entirely understood due to the complexity of its downstream signaling pathways. Therefore, the contribution of RhoA and its effector kinase PKN on TNF induced barrier dysfunction was investigated *in vitro*.

An inducible expression system that allowed the doxycycline controlled expression of a constitutively active (CA) RhoA and PKN mutant as well as a dominant negative (DN) PKN mutant was generated. Continuous expression of CA RhoA had no effect on differentiation processes in Caco-2 cells, but the induction of CA RhoA expression led to an impaired epithelial barrier. Simultaneous Interferon- γ and TNF treatment also resulted in barrier perturbation, but this defect was attenuated when CA RhoA was expressed. As treatment with TNF resulted in activation of the RhoA effector kinase PKN, this protein constitutes a candidate molecule for the mediation of these effects. Inhibition of PKN by Bisindolylmaleimide I, Ro-31-8220 or the specific inhibitory peptide PRL as well as expression of a dominant negative PKN mutant aggravated TNF-induced barrier dysfunction, characterized by a decline in transepithelial electrical resistance and increased permeability for molecules with a size from 3,78 to 7,29 angstroms. These alterations were accompanied by an increase in myosin light-chain and NF- κ B p65 subunit phosphorylation level as well as morphological changes of the tight junctions. Conversely, expression of a CA PKN mutant attenuated or prevented the decrease in epithelial resistance, the increase in ion permeability, the increase in NF- κ B p65 and MLC phosphorylation and the alterations of cell morphology after TNF treatment.

These results provide support for a potential role of the RhoA effector kinase PKN in modulating the barrier disrupting effects of TNF in the intestinal epithelium. Given the importance of barrier dysfunction for inflammatory bowel diseases, PKN poses a potential target for the development of future intervention strategies.

Keywords:

TNF- α , RhoA, PKN, PKN1, tight junction, barrier dysfunction

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	II
ABSTRACT	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen.....	1
1.1.1 Bedeutung einer gestörten Barrierefunktion für die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen.....	3
1.2 Der <i>tight junction</i> Komplex.....	4
1.2.1 Lokalisation und Funktion	4
1.2.2 Komponenten von <i>tight junctions</i>	5
1.2.3 Molekulare Mechanismen der Regulation der <i>tight junction</i> Permeabilität.....	9
1.3 Die kleine Rho-GTPase RhoA	10
1.3.1 Struktur	10
1.3.2 Regulation und Funktion.....	11
1.4 Die Serin/Threoninkinase PKN	12
1.4.1 Struktur	13
1.4.2 Regulation und Funktion.....	14
1.5 Mechanismen der Regulation der epithelialen Barrierefunktion durch die proinflammatorischen Zytokine TNF und IFN	15
1.6 Ziel der Arbeit.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Material	20
2.1.1 Antikörper	20
2.1.2 Bakterienstämme.....	21
2.1.3 Chemikalien	22
2.1.4 Enzyme	24
2.1.5 Geräte und Zubehör	24
2.1.6 Kits.....	25
2.1.7 Lösungen.....	26

2.1.8	Marker	30
2.1.9	Vektoren und Plasmide	30
2.1.10	Zelllinien	30
2.1.11	Zytokine	31
2.2	Methoden	32
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	32
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	36
2.2.3	Zellbiologische Methoden	38
2.2.4	Immunologische Methoden	42
2.2.5	Elektrophysiologische Methoden	45
2.2.6	Statistische Auswertung	47
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Validierung der TNF-induzierten Barrierestörung	48
3.2	Effekte der RhoA-Aktivierung auf die epitheliale Barriere	51
3.2.1	Generierung eines induzierbaren Expressionssystems für konstitutiv aktives RhoA	51
3.2.2	Etablierung eines induzierbaren Expressionssystems für konstitutiv aktives RhoA	53
3.2.3	Charakterisierung des Induktionsverhaltens des konstitutiv aktiven RhoA Zellklons	54
3.2.4	Validierung der Funktionalität der untersuchten RhoA-Mutante	56
3.2.5	Einfluss von Doxzyklin bzw. der RhoA-Expression auf die Differenzierung der untersuchten Zellklone	57
3.2.6	Transepitheliale elektrische Widerstände der konstitutiv aktiven RhoA-Mutante	58
3.2.7	Aktivierte Signalwege nach KA RhoA-Induktion	59
3.3	Transepitheliale elektrische Widerstände nach IFN- und kombinierter IFN/TNF-Behandlung	61
3.4	Der RhoA Effektor PKN wird nach kombinierter IFN- und TNF-Behandlung aktiviert	62
3.5	Transepitheliale elektrische Widerstände nach gleichzeitiger Gabe von IFN/TNF und PKN-Inhibitoren	64
3.6	Spezifische Inhibition von PKN mit dem Inhibitorpeptid PRL	66
3.7	Etablierung eines induzierbaren Expressionssystems für konstitutiv aktives und dominant negatives PKN	68
3.7.1	Klonierung einer konstitutiv aktiven und dominant negativen PKN-Mutante und Validierung der induzierbaren Expression	68
3.8	Transepitheliale elektrische Widerstände nach kombinierter IFN- und TNF-Behandlung in KA und DN PKN exprimierenden Zellen	70

3.9	Transepitheliale elektrische Widerstände nach Inhibition von PKN mittels Ro 31-8220 und gleichzeitiger Expression von DN oder KA PKN.....	72
3.10	Ionenpermeabilität in DN PKN und KA PKN exprimierenden Zellen	74
3.11	Charakterisierung der beteiligten Signaltransduktionswege nach IFN/TNF-Behandlung	76
3.12	MLCK-Inhibition mit Hilfe des Inhibitorpeptides PIK	78
3.13	Morphologie von KA und DN PKN Zellen nach IFN/TNF-Behandlung	80
3.14	Längerfristige Auswirkungen der Expression von PKN-Mutanten auf die epitheliale Barriere nach IFN/TNF-Behandlung.....	82
4	DISKUSSION	84
4.1	Caco-2 und T84 Zellen als <i>in vitro</i> Modell der intestinalen Barriere	84
4.2	Validierung der TNF-induzierten Barrierestörung	85
4.3	Das induzierbare Tet-Off Expressionssystem.....	87
4.4	Effekte der RhoA-Aktivierung auf die epitheliale Barriere.....	89
4.5	Aktivierung des RhoA Effektors PKN nach kombinierter IFN- und TNF-Behandlung.....	92
4.6	TEW nach Inhibition von PKN und kombinierter IFN- und TNF-Behandlung.....	93
4.7	Effekte der induzierbaren Expression einer konstitutiv aktiven oder dominant negativen PKN-Mutante auf die epitheliale Barrierefunktion	94
4.7.1	Transepitheliale elektrische Widerstände nach Inhibition von PKN mittels Ro 31-8220 und gleichzeitiger Expression von DN oder KA PKN	94
4.7.2	Charakterisierung der Ionenpermeabilität und der beteiligten Signaltransduktionswege in DN und KA PKN exprimierenden Zellen nach IFN- und TNF-Behandlung	95
4.8	Schlussfolgerung und hypothetisches Modell zur Rolle von PKN bei der TNF-induzierten Barrieredysfunktion.....	99
	LITERATURVERZEICHNIS.....	103
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	119
	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	121

DANKSAGUNG	123
LEBENS LAUF	124
PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	125
SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	126

1 Einleitung

1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen

Unter dem Begriff der chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) werden eine Gruppe von chronischen, häufig in Schüben verlaufenden Erkrankungen mit rezidivierenden Entzündungen des Gastrointestinaltraktes zusammengefasst (Baumgart und Sandborn, 2007). Sie weisen in den westlichen Industrienationen eine Inzidenz von bis zu 20,3 pro 100.000 Einwohner auf (Loftus, 2004) und beide Krankheitsbilder manifestieren sich meistens im Alter zwischen 15 und 30 Jahren (Russel und Stockbrugger, 1996). Damit sind sie Ursache einer erheblichen Morbidität und verursachen allein in Deutschland pro Jahr 466 Millionen Euro an Kosten für das Gesundheitssystem (Prenzler *et al.*, 2011). Studien zeigten darüber hinaus, dass sich bezüglich der Inzidenzraten innerhalb dieser Regionen ein Gefälle zwischen Nord und Süd etabliert hat (Loftus, 2004).

Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa sind die zwei Hauptvertreter dieser Erkrankungen, die einige klinische Gemeinsamkeiten besitzen (Tabelle 1) und nicht immer exakt voneinander zu trennen sind (10 - 15 % der Fälle). Colitis Ulcerosa ist auf das Kolon beschränkt und durch nicht transmurale, durchgängige Entzündungen, häufige Kryptenabszesse und Ulzerationen charakterisiert.

Tabelle 1-1 | Beispiele der klinischen Symptome und der pathologischen Befunde von Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn Patienten

Symptome und Pathologie	Colitis Ulcerosa	Morbus Crohn
Abgang von Blut und Schleim	Häufig	Selten
Dünndarmbefall	Nein	Ja
Extraintestinale Manifestationen	Häufig	Häufig
Fisteln	Nein	Häufig
Hämatochezie	Häufig	Selten
Kolonobstruktion	Selten	Häufig
Transmurale Entzündungen	Nein	Ja
Kryptenabszesse	Ja	Ja
Granulome	Selten	Häufig
Malignome	Erhöht (Kolonkarzinom)	Gering erhöht (Dünndarmkarzinom)

Bei Morbus Crohn hingegen kann es im gesamten Gastrointestinaltrakt zum Auftreten von abschnittswisen transmuralen Entzündungen sowie Fistelbildung und Kolonobstruktionen kommen (Baumgart und Sandborn, 2007; Danese und Fiocchi, 2011; Torres und Rios, 2008).

Die Symptome einer Colitis Ulcerosa Erkrankung umfassen typischerweise blutige Diarrhöen, abdominelle Schmerzen sowie das Ausscheiden von Eiter und/oder Schleim. Bei Morbus Crohn Patienten kommt es häufig zu abdominellen Schmerzen, Fieber und nicht blutigen Diarrhöen (Baumgart und Sandborn, 2007).

Für die Therapie dieser Erkrankungen stehen mehrere Optionen zur Verfügung, welche entsprechend dem Krankheitsverlauf auf die jeweilige Patientensituation adaptiert werden. Häufig verwendet werden 5-Aminosalicylsäure, Kortikosteroide und Immunmodulatoren (Baumgart und Sandborn, 2007). Durch die Entwicklung sogenannter Biologika haben sich die therapeutischen Optionen bei diesen Erkrankungen erheblich erweitert. Hierbei handelt es sich um Therapiestrategien, die aktuell vor allem gegen das pro-inflammatorische Zytokin Tumornekrosefaktor α (TNF) gerichtet sind und eine anti-inflammatorische Aktivität bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa aufweisen. Verschiedene Studien zeigen bei der Verwendung dieser anti-TNF-Biologika eine Abnahme der Entzündung bei Morbus Crohn (Baert *et al.*, 1999) und Colitis Ulcerosa Patienten (Rutgeerts *et al.*, 2005). Trotz dieser Fortschritte bei der Behandlung von CED-Patienten sind weitere Verbesserungen der vorhandenen therapeutischen Optionen notwendig, denn sowohl die Raten der Remissionserhaltung als auch die Nebenwirkungsprofile der Therapien sind noch nicht zufriedenstellend. Das gehäufte Auftreten von schweren Infektionen und Lymphomen sind als negative Aspekte der anti-TNF-Interventionsstrategien zu nennen (Bongartz *et al.*, 2006).

Eine Ursache für die begrenzte Zahl therapeutischer Optionen liegt darin begründet, dass die Ätiologie der CED zum jetzigen Zeitpunkt nicht abschließend geklärt ist. Neben den in genomweiten Assoziationsstudien identifizierten Suszeptibilitätsregionen, der mikrobiellen Flora und verschiedenen Umweltfaktoren spielt die Dysregulation des Immunsystems eine wichtige Rolle für die komplexe Pathogenese (Baumgart und Carding, 2007; Podolsky, 2002), welche bei Morbus Crohn Patienten unter anderem mit einer erhöhten Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF, Interferon- γ , Interleukin (IL)-6 und IL-1 assoziiert ist (Bruewer *et al.*, 2006; Reinecker *et al.*, 1993). Darüber hinaus existieren auch Hinweise auf eine wesentliche Bedeutung einer intestinalen Barriestörung für die Pathogenese dieser Erkrankungen, die im folgenden Abschnitt detaillierter dargestellt werden sollen.

1.1.1 Bedeutung einer gestörten Barrierefunktion für die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen

Zahlreiche Studien konnten in CED-Patienten eine erhöhte Permeabilität des intestinalen Epithels nachweisen (Marchiando *et al.*, 2010; Schulzke *et al.*, 2009; Turner, 2009), wobei der Grad der Permeabilitätserhöhung mit der Krankheitsaktivität korrelierte (Marchiando *et al.*, 2010). Während die entzündliche Aktivität und die damit einhergehende Schädigung des intestinalen Epithels zweifellos eine wesentliche Rolle für diese Beobachtung spielt, existieren jedoch ebenfalls Hinweise darauf, dass diese Barriestörung selbst zur Pathogenese der Erkrankungen beiträgt.

So konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der intestinalen Permeabilität während der Remissionsphasen einer erneuten Verschlechterung des Krankheitszustandes voraus geht (Wyatt *et al.*, 1993). Des weiteren weisen selbst gesunde Verwandte von CED-Patienten überdurchschnittlich häufig Beeinträchtigungen der Barriere auf (Hollander *et al.*, 1986). Auch in Phasen der Remission und in makroskopisch nicht betroffenen Mukosaabschnitten zeigen Patienten strukturelle und funktionelle Auffälligkeiten der Barriere (Peeters *et al.*, 1994). Auf molekularer Ebene konnten in CED-Patienten Störungen der intestinalen Barrierefunktion nachgewiesen werden, welche durch eine reduzierte Anzahl an *tight junction* Strängen sowie eine veränderte Claudin- und Occludinexpression charakterisiert sind (Schulzke *et al.*, 2009). Darüber hinaus konnte auch in mehreren Tiermodellen gezeigt werden, dass Störungen von Barrierekomponenten zur Ausbildung von akuten Entzündungen oder einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber einer experimentellen Kolitis führen (Hermiston und Gordon, 1995; Su *et al.*, 2009; Vetrano *et al.*, 2008).

Aufgrund dieser Beobachtungen geht man zum jetzigen Zeitpunkt davon aus, dass für die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen drei Kriterien erfüllt sein müssen. Die Barrierefunktion muss beeinträchtigt sein (1.), wodurch immunstimulatorische Antigene vom *Milieu extérieur* ins *Milieu intérieur* gelangen (2.) und dort eine Immunantwort auslösen können (3.). Somit führt diese Kaskade in der Konsequenz zur Ausbildung eines *circulus vitiosus* (Clayburgh *et al.*, 2004).

Dies legt eine wichtige Rolle einer intakten intestinalen Barriere nahe, welche aus verschiedenen immunologischen und nicht-immunologischen Komponenten gebildet wird (Farhadi *et al.*, 2003). Der *tight junction* Komplex ist dabei wesentlich an der Modulation der parazellulären Permeabilität beteiligt und er steht im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit,

weshalb die Strukturen und die Regulationsmechanismen im nächsten Abschnitt genauer dargestellt werden.

1.2 Der *tight junction* Komplex

1.2.1 Lokalisation und Funktion

Tight junctions (lat. *Zonulae occludentes*) sind Teil des apikalen Verbindungskomplexes, der aus *tight junctions*, *adherens junctions* und Desmosomen besteht und dessen Feinstruktur erstmals 1963 mit Hilfe elektronenmikroskopischer Aufnahmen aufgelöst werden konnte (Farquhar und Palade, 1963). Sie befinden sich am apikalen Ende der lateralen Zellmembran und versiegeln den interzellulären Zwischenraum benachbarter Epithelzellen (Abbildung 1-1).

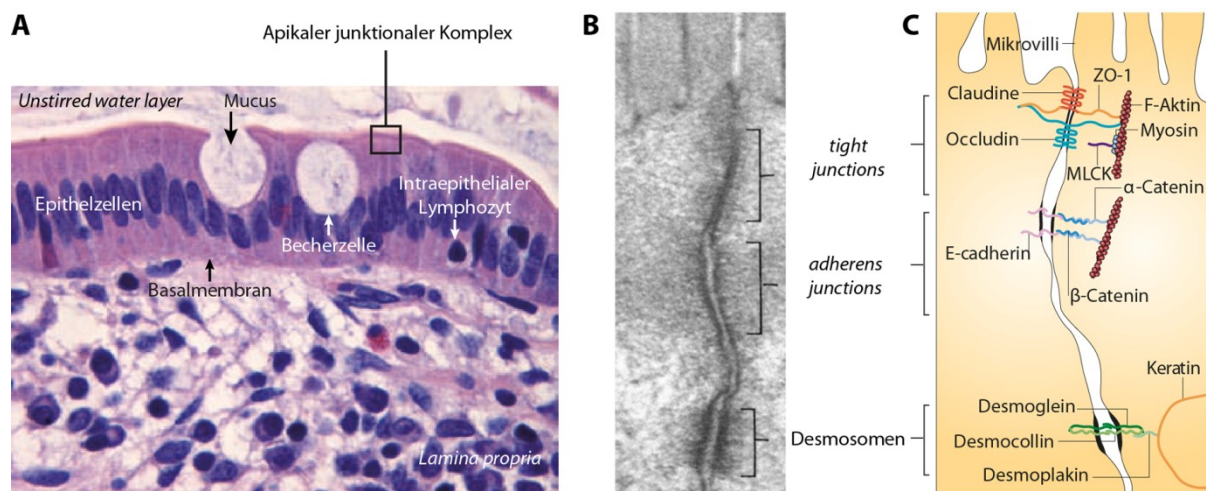


Abbildung 1-1 | Struktur der intestinalen Barriere A) Die intestinale Barriere besteht aus miteinander verbundenen Epithelzellen, welche auf ihrer apikalen Seite von einer Mucusschicht bedeckt sind. Der *unstirred water layer* kennzeichnet dabei den Grenzbereich zwischen Darmlumen und Zellmembran. Becherzellen sind für die Mucusbildung verantwortlich. Unterhalb der Basalmembran befindet sich die *Lamina propria*, welche verschiedene Immunzellen beherbergt (z.B. Makrophagen und dendritische Zellen). Intraepitheliale Lymphozyten besitzen als zytokinproduzierende Zellen regulatorische Funktionen bei der Immunantwort. B) Elektronenmikroskopische Darstellung des apikalen Bereiches einer intestinalen Epithelzelle. C) Schematische Darstellung des apikalen Bereiches einer intestinalen Epithelzelle. Modifiziert nach (Fawcett, 1966; Hayday *et al.*, 2001; Turner, 2009).

Diese Versiegelung stellt eine selektive Barriere zwischen dem *Milieu extérieur* und dem *Milieu intérieur* dar, welche die parazelluläre Diffusion von Ionen, Wasser und anderen Molekülen verhindert.

So ist z.B. der Darm die größte Oberfläche im Körper, die mit der Umgebung in Kontakt steht und eine Vielzahl an Prozessen, darunter die Nährstoffaufnahme, die Wasser- und

Ionenhomöostase reguliert sowie parallel dazu ein Barriere gegen Pathogene bzw. die intestinale Mikroflora bilden muss (Popoff und Geny, 2009). Diese Eigenschaften von *tight junctions* werden auch unter dem Begriff Barrierefunktion bzw. *gate function* zusammengefasst (Turksen und Troy, 2011). Zusätzlich zur Regulation der parazellulären Route verhindern *tight junctions* die laterale Diffusion von Proteinen innerhalb der Zellmembran (*fence function*) und ermöglichen somit die Ausbildung einer Zellpolarität (Cereijido *et al.*, 2008).

Anders als ursprünglich angenommen ist die Dichtheit dieser Barriere gewebespezifisch und kann dynamisch reguliert werden (Matter und Balda, 2003; Schneeberger und Lynch, 2004). In die Regulation der *tight junction* Funktion sind unter anderem Occludin, Claudine, ZO-1, RhoA und MLCK involviert.

Unterhalb der *tight junctions* sind die *adherens junctions* (lat. *Zonulae adhaerentes*) lokalisiert, welche über die extrazellulären Domänen von Cadherinen benachbarte Zellen mechanisch verbinden und zytoplasmatisch Verbindungen mit dem Aktin-Zytoskelett über Catenin-Adapterproteine ermöglichen (Harris und Tepass, 2010). Basal der *adherens junctions* befinden sich die Desmosomen (lat. *Maculae adhaerentes*), die ähnlich den *adherens junctions* mechanische Stabilität über die Verbindung der Zytoskelette benachbarter Zellen ermöglichen (Garrod und Chidgey, 2008).

1.2.2 Komponenten von *tight junctions*

Zum jetzigen Zeitpunkt sind mehr als 50 *tight junction* assoziierte Proteine identifiziert worden (Marchiando *et al.*, 2010). Als wichtigste Komponenten einer intakten epithelialen Barriere wurden die Transmembranproteine Occludin, die Claudin- und die JAM-Familie sowie die sogenannten Adapterproteine, welche die Komponenten des *tight junction* Komplexes mit dem Aktin-Zytoskelett und verschiedenen Signalproteinen verbinden, beschrieben. Prominente Vertreter der Adapterproteine sind die *Zonulae occludentes* Proteine ZO-1, ZO-2 und ZO-3 (Balda und Matter, 2008).

1.2.2.1 Occludin

Occludin wurde 1993 als integrales Membranprotein, welches ausschließlich an den *tight junctions* epithelialer und endothelialer Zellen lokalisiert ist, identifiziert (Furuse *et al.*, 1993). Es besitzt ein Molekulargewicht von etwa 65 kDa und besteht aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen, sowie einer N-terminalen und einer

C-terminalen zytoplasmatischen Domäne, über welche es an ZO-1, ZO-2 und ZO-3 binden kann (Furuse *et al.*, 1994; Haskins *et al.*, 1998; Itoh *et al.*, 1999) (Abbildung 1-2).

Die Funktion von Occludin konnte noch nicht vollständig entschlüsselt werden, da verschiedene Publikationen hinsichtlich seiner Rolle bei der Formierung von *tight junctions* veröffentlicht wurden. Zum einen scheint Occludin in die Regulation der epithelialen Barriere involviert zu sein, da Überexpressionsstudien einen Anstieg des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEW), welcher ein Maß für die Barrierefunktion darstellt (Blikslager *et al.*, 2007), demonstrieren konnten (McCarthy *et al.*, 1996). Es konnte auch gezeigt werden, dass es in Occludin-Null Fibroblasten mit ZO-1 kolokalisiert und die Zell-Zell-Adhäsion dieser Zellen ermöglicht (Van Itallie und Anderson, 1997).

Zum anderen existieren Daten, die Argumente gegen die Annahme, Occludin sei eine kritische Barrierekomponente, liefern, denn Occludin-defiziente embryonale Stammzellen können ebenfalls funktionelle *tight junction* Strukturen ausbilden (Saitou *et al.*, 1998).

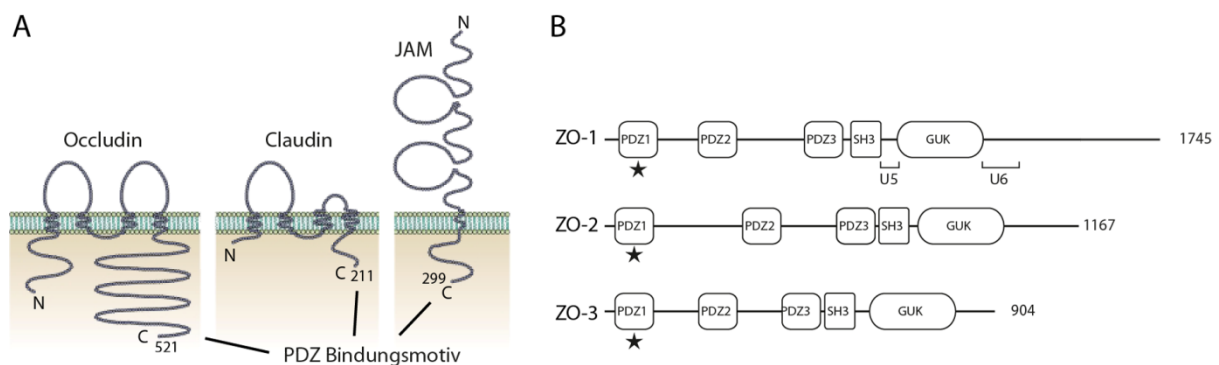


Abbildung 1-2 | Struktur von Occludin, Claudin, JAM und ZO-Proteinen A) Dargestellt ist die Struktur der wichtigsten Komponenten von epithelialen *tight junctions*. Occludin und die Claudine besitzen vier Transmembranhelices und zwei extrazelluläre Schleifen. JAM besitzt nur eine Transmembranhelix, aber ebenfalls zwei extrazelluläre Schleifen. Alle Proteine besitzen ein PDZ-Bindemotiv, welches die Bindung an zytoplasmatisch lokalisierte ZO-Adapterproteine ermöglicht. B) Dargestellt sind die drei ZO-Adapterproteine, welche die Bindung von *tight junction* Proteinen mit dem Aktin-Zytoskelett ermöglichen. Die dafür notwendigen PDZ-Domänen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Modifiziert nach (Furuse, 2010; Tsukita *et al.*, 2001).

Auch Occludin-defiziente Mäuse sind befähigt, intakte *tight junctions* auszubilden, sie weisen jedoch komplexe phänotypische Veränderungen wie z.B. Wachstumsverzögerungen, Kalzifizierungen des Gehirns, testikuläre Atrophie und eine chronische Inflammation des Magenepithels auf (Saitou *et al.*, 2000).

Neuere Veröffentlichungen legen eine regulative Beteiligung an der TGF- β -induzierten epithelialen-mesenchymalen Transition nahe, welche durch den Abbau der epithelialen *tight*

junction Struktur charakterisiert ist (Barrios-Rodiles *et al.*, 2005). Zusammenfassend scheint Occludin, dessen Funktion über eine Vielzahl an posttranskriptionellen und –translationellen Modifikationen moduliert werden kann (Cummins, 2012), eine komplexe und bislang nicht vollständig verstandene Rolle bei der Regulation der *tight junction* Funktion zu spielen.

1.2.2.2 Die Claudin-Proteinfamilie

Die ersten beiden Proteine (Claudin-1 und Claudin-2) dieser inzwischen in Säugetieren 27 Mitglieder zählenden Claudin-Proteinfamilie wurden 1998 erstmals als integrale *tight junction* Membranproteine beschrieben (Furuse *et al.*, 1998).

Sie besitzen ein Molkulargewicht von 20 – 27 kDa und, ähnlich wie Occludin, vier Transmembranhelices, zwei extrazelluläre Schleifen sowie die im Zytoplasma befindlichen N- und C-Termini (Van Itallie und Anderson, 2006) (Abbildung 1-2).

Sie werden in bereits vorhandene epitheliale *tight junctions* inkorporiert (Furuse *et al.*, 1998) oder sind in *tight junction* defizienten Maus Fibroblasten zur *de novo* Formierung von *tight junction* Strängen befähigt (Furuse *et al.*, 1998).

Das gewebsspezifische Expressionsmuster und ihre Fähigkeit, homo- bzw. heterophile Interaktionen mit Claudinen benachbarter Zellen einzugehen (Piontek *et al.*, 2008), ermöglicht eine Kombinationsvielfalt, welche für die Variation der Permeabilität gegenüber gelösten Stoffen und Molekülen verantwortlich ist (Abbildung 1-3). So konnte für Claudin-2 gezeigt werden, dass es den transepithelialen elektrischen Widerstand durch die Bildung von kationenselektiven Poren verringert (Amasheh *et al.*, 2002). Andere Claudine, darunter Claudin-1, 4, 5 und 8, werden demgegenüber mit abdichtenden Eigenschaften assoziiert (Van Itallie und Anderson, 2006), welche demzufolge den TEW erhöhen.

Mit Hilfe von Mutationen der ersten extrazellulären Schleife konnte gezeigt werden, dass diese an der Vermittlung von Ladungsselektivität beteiligt ist (Colegio *et al.*, 2002). Die zweite extrazelluläre Schleife ist über homo- oder heterophile Interaktionen mit Claudinen benachbarter Zellen an der *tight junction* Strangformierung beteiligt. Dies konnte am Beispiel von Claudin-5 gezeigt werden, welches über homophile *trans*-Interaktionen an Claudin-5 benachbarter Zellen bindet (Piontek *et al.*, 2008).

Der C-Terminus aller Claudine (außer Claudin-12) enthält ein PDZ-Bindemotiv (PSD95/DlgA/ZO-1), über welches zytoplasmatisch lokalisierte ZO-Adapterproteine gebunden werden können (Itoh *et al.*, 1999).

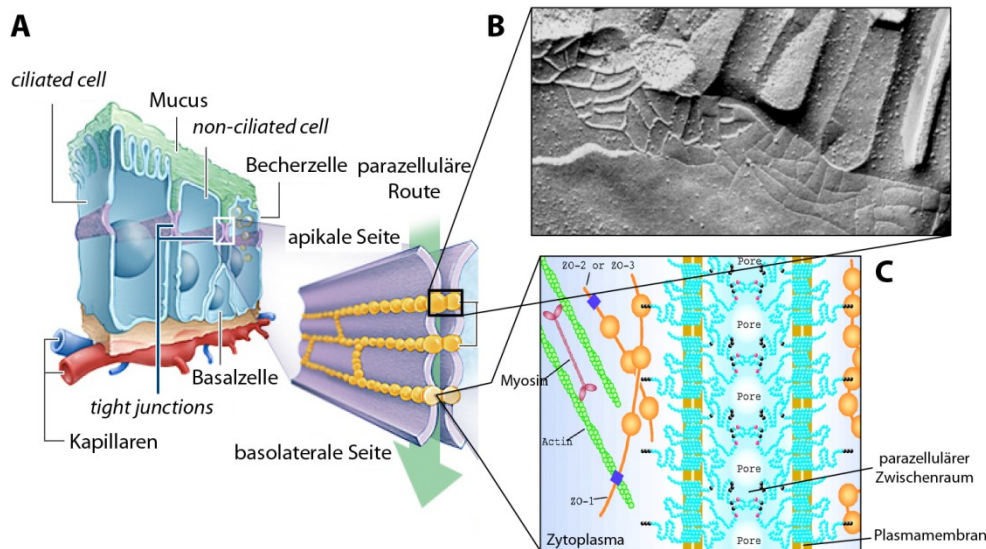


Abbildung 1-3 | Struktur und molekularer Aufbau der *tight junctions* A) Dargestellt ist der schematische Aufbau der intestinalen Epithelschicht und der *tight junctions*. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *tight junction* Strängen, welche durch die Claudin- und Occludin-Proteine gebildet werden. C) Schematische Darstellung der Poren, die durch die extrazellulären Schleifen der unterschiedlichen Claudine geformt werden und damit die Permeabilität von *tight junctions* regulieren. Modifiziert nach (Van Itallie und Anderson, 2004; Van Itallie und Anderson, 2006) und (www.Nastech.com, 2008).

1.2.2.3 Die JAM-Proteinfamilie

Neben Occludin und den Claudinen konnte die aus vier Mitgliedern bestehende JAM-Familie (*junctional adhesion molecules*; JAM-A, -B, -C, -D) als dritte Gruppe von Transmembranproteinen, die mit den *tight junction* Arealen von Epithel- und Endothelzellen assoziiert sind, identifiziert werden. Sie besitzen eine membrandurchspannende, eine extrazelluläre und eine zytoplasmatische Domäne, mit der sie unter anderem Bindungen mit den *tight junction* assoziierten ZO-Adapterproteinen eingehen können (Abbildung 1-2).

JAM-Proteine sind in eine Vielzahl von Prozessen, unter anderem solche, welche die Adhäsion von Leukozyten und Endothelzellen sowie die parazelluläre Transmigration von Leukozyten regulieren, involviert (Bazzoni, 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass JAM-Proteine auch eine Rolle bei der Regulation der mukosalen Homöostase bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen, denn JAM-A *knockout* Mäuse weisen eine Erhöhung der intestinalen Permeabilität, der Zytokinproduktion und der epithelialen Apoptoserate in einem Modell mit chemisch induzierter intestinaler Entzündung auf (Vetrano *et al.*, 2008).

1.2.2.4 ZO-Proteine

ZO-1 wurde für eine Reihe von Epithelzellen als erstes *tight junction* assoziiertes Protein im Jahre 1986 erstmals beschrieben (Stevenson *et al.*, 1986). Neben ZO-1 konnten auch ZO-2 und -3 als Bestandteile des sogenannten zytoplasmatischen Plaques identifiziert werden, welches die *tight junction* und das Aktin-Zytoskelett miteinander verbindet und eine Vielzahl an Prozessen vermittelt, die unter anderem die Regulation der parazellulären Permeabilität, der Migration und der Genexpression beinhalten.

ZO-1 enthält am N-terminalen Ende drei für Proteininteraktionen notwendige PDZ-Domänen, eine SH3-Domäne für Signalproteinbindungen, z.B. ZONAB (*ZO-1-associated nucleic acid binding protein*), eine GUK (*guanylate kinase-like*) Domäne für Occludinbindung und eine Aktin-bindende C-terminale Domäne. Die erste PDZ-Domäne bindet an Claudine, die zweite an ZO-2/ZO-3/Connexin und die dritte an Mitglieder der JAM-Proteinfamilie (Fanning und Anderson, 2009) (Abbildung 1-2).

ZO-Proteine sind für die Ausbildung einer intakten epithelialen Barrierefunktion essenziell, denn sie spielen eine Schlüsselrolle bei den dafür notwendigen Signalprozessen. ZO-1 koordiniert unter anderem mit Hilfe von Cingulin die junctionale Rekrutierung des RhoA aktivierende Moleküls p114RhoGEF, wodurch es zu einer für die Formierung notwendigen Aktivierung von RhoA an der *tight junction* kommt (Terry *et al.*, 2011). Nachdem diese Prozesse abgeschlossen sind, sind ZO-1 und Cingulin auch an der Inaktivierung von RhoA beteiligt (Aijaz *et al.*, 2005).

Eine weitere wichtige Aufgabe beim Aufbau der Barriere ist der gerichtete Transport von Claudinen an die *tight junctions* (Umeda *et al.*, 2006).

1.2.3 Molekulare Mechanismen der Regulation der *tight junction* Permeabilität

Zwei Mechanismen ermöglichen die unabhängige Regulation der parazellulären Permeabilität von Epithelien gegenüber kleinerer geladener Substanzen (*pore pathway*), sowie größerer ungeladener Substanzen (*leak pathway*). Der *pore pathway* ist größten (< 4 Å, 1 Å = 0,1 nm) und ladungsspezifisch und durch das Expressionsmuster sowie die damit verbundenen *trans*-Interaktionen verschiedener Claudin-Isoformen determiniert (siehe Abschnitt 1.2.2.2) und dient somit der längerfristigen Regulation der Barrierefunktion (Shen *et al.*, 2011). So konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Claudin-2 Expression in MDCK Zellen nach vier Tagen die Permeabilität von Molekülen erhöht, die kleiner als vier Ångström groß sind (Van Itallie *et al.*, 2008).

Im Gegensatz dazu dient der *leak pathway* der akuten Regulation des nicht-ionenselektiven Transports von größeren Makromolekülen über die MLCK-vermittelte mechanische Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts (Shen *et al.*, 2011) (siehe Abschnitt 1.5). Dabei konnten die Zytokine IFN und TNF als Induktoren einer über den *leak pathway* vermittelten Erhöhung der parazellulären Permeabilität identifiziert werden (Watson *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2010).

Neben der unabhängigen Regulation konnte die Interaktion dieser beiden Mechanismen demonstriert werden. Nach der Aktivierung von MLCK kommt es zu einer *leak pathway*-vermittelten Erhöhung der Permeabilität, welche eine verstärkte IL-13 Synthese zur Folge hat. Als Resultat des höheren IL-13 Niveaus ist eine Zunahme der Claudin-2 Expression und damit eine Regulation des *pore pathways* zu beobachten (Weber *et al.*, 2010).

Die zellulären Ereignisse nach der TNF-vermittelten Aktivierung von MLCK waren Gegenstand einer Vielzahl an Arbeiten, jedoch sind die übergeordneten Signaltransduktionswege noch nicht vollständig aufgeklärt. Insbesondere das Verständnis der Rolle RhoA-abhängiger Signalprozesse ist noch lückenhaft, weshalb weitere Untersuchungen notwendig sind.

1.3 Die kleine Rho-GTPase RhoA

1.3.1 Struktur

Bis zum jetzigen Zeitpunkt sind 22 Säugetiiergegene beschrieben worden, die Mitglieder der kleinen Rho-GTPasen kodieren (Aspenstrom *et al.*, 2004). Sie wurden erstmals aus der Seeschnecke *Aplysia* isoliert (Madaule und Axel, 1985) und sind Teil der ras-Superfamilie (*ras-homologous*) und lassen sich in die Rho, Rac, Cdc42 und weitere Unterfamilien einteilen, welche untereinander eine 85-prozentige Homologie bezüglich ihrer Aminosäuresequenz aufweisen (Ridley, 1997).

Rho-GTPasen sind monomere G-Proteine mit einem Molekulargewicht von 20 – 40 kDa (Takai *et al.*, 2001), die als molekularer Schalter agieren und zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand wechseln können (Jaffe und Hall, 2005). Nach der Bindung von GTP kommt es zu einer Konformationsänderung in der sogenannten Schalter I (Aminosäuren 23 bis 40, Interaktion mit ROCK und Citron) und Schalter II (Aminosäuren 75 bis 92, Interaktion mit ROCK und Rhophilin) Region von RhoA, die für eine Effektoraktivierung notwendig sind (Fujisawa *et al.*, 1998).

1.3.2 Regulation und Funktion

Die Regulation der Rho Funktionalität erfolgt über drei unterschiedliche Gruppen von Proteinen, die GEFs (*guananine nucleotide exchange factors*), die GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*) und die GAPs (*GTPase activating proteins*). GEF Proteine vermitteln den Austausch von GDP mit GTP und damit die Aktivierung der Rho Proteine (Schmidt und Hall, 2002). GDI Proteine inhibieren den GDP-GTP Austausch und verhindern damit die Aktivierung der Rho-GTPasen. Zusätzlich zu dieser Funktion sind sie auch für die Translokation zwischen Zytosol und Zellmembran verantwortlich (Sasaki und Takai, 1998). Die GAP Proteine stellen die dritte Gruppe von Rho-Regulatoren dar, denn sie besitzen die Fähigkeit, die intrinsische GTPase-Aktivität von Rho-GTPasen zu aktivieren, was letztlich zu einer Inaktivierung des jeweiligen Moleküls führt (Bernards, 2003) (Abbildung 1-4).

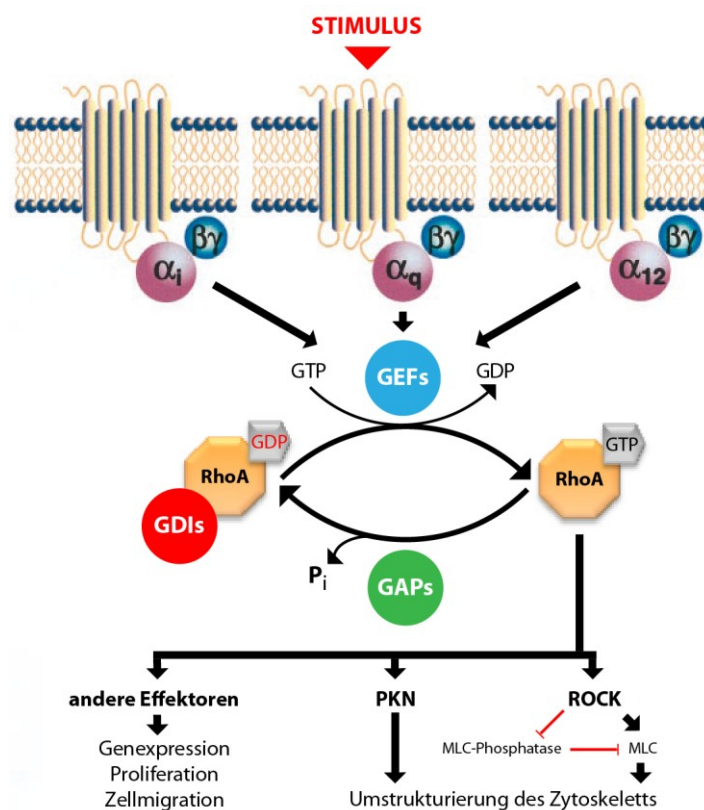


Abbildung 1-4 | Regulation und Funktion der kleinen Rho-GTPase RhoA Verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren können nach Stimulation über ihre jeweiligen Untereinheiten die Aktivierung von GEFs bewirken. Diese katalysieren konsekutiv den GDP/GTP Austausch, womit es zu einer Aktivierung von RhoA kommt. Nach Aktivierung kann eine Vielzahl an zellulären Signalwegen moduliert werden; dargestellt sind die in die Regulation der epithelialen Barriere-funktion involvierten Wege. Die GAPs aktivieren die intrinsische GTPase-Aktivität von RhoA, was letztlich zu einer Inaktivierung führt. GDI Proteine verhindern den GDP/GTP Austausch und stellen damit eine weitere Gruppe von Rho-Regulatoren dar. Modifiziert nach (Jaffe und Hall, 2005; Seasholtz *et al.*, 1999).

Nach ihrer Aktivierung sind Rho-Proteine in der Lage, mit über 50 zellulären Effektoren zu interagieren und somit eine Vielzahl an zellulären Prozessen wie zum Beispiel die Regulation des Aktin-Zytoskeletts, die Genexpression, die Zellproliferation und -migration zu beeinflussen (Jaffe und Hall, 2005). Darüber hinaus konnte in verschiedenen Modellsystemen für RhoA eine Beteiligung an der Regulation der *tight junction* Funktion beobachtet werden. Sowohl die Aktivierung mit Hilfe einer konstitutiv aktiven RhoA-Mutante (Jou *et al.*, 1998) oder des zytotoxisch-nekrotisierenden Faktors (CNF-1) (Hopkins *et al.*, 2003) als auch die Inaktivierung durch eine dominant negative Mutante (Jou *et al.*, 1998) oder die *Clostridium botulinum* Toxin C3 Transferase (Nusrat *et al.*, 1995) von RhoA resultiert in einer beeinträchtigten Barrierefunktion, welche durch eine erhöhte Permeabilität gegenüber Markersubstanzen und eine Verminderung des transepithelialen elektrischen Widerstandes charakterisiert ist. Dies deutet darauf hin, dass die Wirkung von RhoA komplex ist und der zelluläre Kontext sowie eine Vielzahl an beteiligten Effektoren für die Formierung und Aufrechterhaltung der Barrierefunktion von essenzieller Bedeutung sind (Matter und Balda, 2003).

Ein wichtiger RhoA-Effektor ist die Rho-assoziierte Proteinkinase (ROCK), für die ebenfalls eine Beteiligung an der Regulation der *tight junction* Funktion von intestinalen, epithelialen Zellen gezeigt werden konnte (Walsh *et al.*, 2001). Dies geschieht vermutlich über eine Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus der Myosin Leichtkette 2 (MLC), denn ROCK kann sowohl die Myosinphosphatase inhibieren (Kimura *et al.*, 1996) als auch direkt die MLC phosphorylieren (Amano *et al.*, 1996).

Aufgrund der erwähnten Komplexität der RhoA beeinflussten Signalwege sind neben ROCK höchstwahrscheinlich noch andere Effektoren in die Regulation des Aktin-Zytoskeletts und der Barrierefunktion involviert, welche in zukünftigen Studien identifiziert werden müssen. Ein Kandidatenmolekül, das im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, ist PKN, dessen Eigenschaften und Funktionen im nächsten Abschnitt genauer charakterisiert werden.

1.4 Die Serin/Threoninkinase PKN

Die ubiquitär exprimierte RhoA Effektorkinase PKN (*protein kinase novel*) wurde 1984 erstmals aus Rattenleberextrakten isoliert und initial als PAK-1 (*protease-activated kinase*) beschrieben (Gabrielli *et al.*, 1984). 1994 erfolgte die Isolation von PKN cDNA aus einer humanen Hippocampus-cDNA-Bibliothek (Mukai und Ono, 1994). Spätere Untersuchungen

zeigten, dass es sich bei PAK-1 und PKN um identische Proteine handelt (Peng *et al.*, 1996). Synonym verwendet werden auch PRK1 (*Proteinkinase C-related kinase 1*) und PKN α . Neben PKN existieren noch das ubiquitär exprimierte PKN2 (Mukai, 2003; Quilliam *et al.*, 1996) und das in adultem Gewebe kaum vorhandene PKN β , welches in verschiedenen Krebszelllinien vorkommt (Oishi *et al.*, 1999).

1.4.1 Struktur

In Abbildung 1-5 ist schematisch die Struktur von PKN und seiner beiden Isoformen dargestellt. PKN besteht aus 942 Aminosäuren und besitzt ein errechnetes Molekulargewicht von etwa 104 kDa. In der N-terminale Region befinden sich drei ACC (*antiparallel coiled-coil*) Domänen von jeweils etwa 70 Aminosäuren Länge. Am C-Terminus befindet sich die etwa 380 Aminosäuren umfassende Serin/Threoninkinasedomäne, welche eine hohe Sequenzhomologie zur Kinasedomäne der Proteinkinase C Familie aufweist (Mukai und Ono, 1994). Zwischen den ACC Domänen und der Kinasedomäne befindet sich eine Domäne mit einer schwachen Homologie zur C2 Domäne von PKC ϵ und η , welche eine autoinhibitorische arachidonsäuresensitive Domäne besitzt (Yoshinaga *et al.*, 1999).

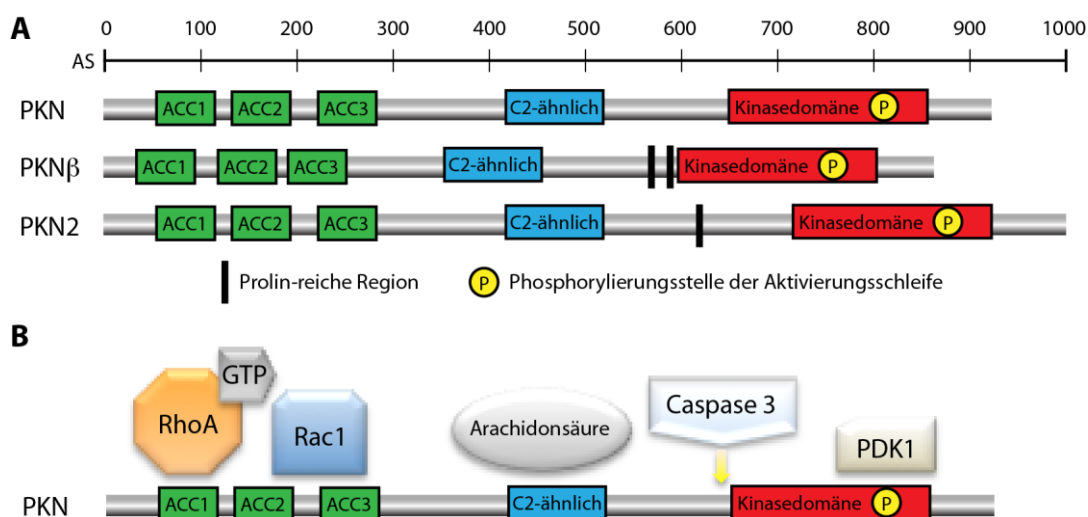


Abbildung 1-5 | Struktur und Interaktionspartner der RhoA Effektorkinase PKN A) Schematische Darstellung der Struktur von PKN, PKN β und PKN2 inklusive der bekannten Domänen. B) Dargestellt sind die jeweiligen Bindungsstellen der verschiedenen Interaktionspartner innerhalb von PKN. Modifiziert nach (Mukai, 2003).

1.4.2 Regulation und Funktion

Arachidon- und Linolsäure konnten als Aktivatoren von PKN identifiziert werden (Mukai *et al.*, 1994). Neben diesen mehrfach ungesättigten Fettsäuren konnte RhoA als PKN-Aktivator identifiziert werden, der GTP-abhängig an die erste ACC Domäne bindet und damit die katalytische Domäne von PKN freilegt (Maesaki *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1996). Dadurch kann PDK1 binden und nachfolgend einen Threoninrest (T774) innerhalb der Aktivierungsschleife phosphorylieren, wodurch es zu einer Aktivierung von PKN kommt (Mukai, 2003). Eine zusätzliche Art der Aktivierung stellt die proteolytische Abspaltung der katalytischen Domäne und somit die Freisetzung der konstitutiv aktiven Kinasedomäne durch Caspase-3 dar (Takahashi *et al.*, 1998) (Abbildung 1-5).

PKN wurde *in vitro* mit einer Vielzahl biologischer Funktionen in Verbindung gebracht, darunter Vesikeltransport (Kawamata *et al.*, 1998), Glukosetransport (Standaert *et al.*, 1998), Zellzyklusregulation (Misaki *et al.*, 2001), Regulation der Genexpression (Shibata *et al.*, 1999) und Tumorigenese (Gao *et al.*, 2000). Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass PKN eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung einiger der bekannten RhoA-Effekte auf das Zytoskelett und von kontraktilen Prozessen spielt. So ist PKN *in vitro* in der Lage, CPI-17, einen Inhibitor der Myosin-Phosphatase (Li *et al.*, 1998), zu phosphorylieren und damit seine Aktivität zu erhöhen (Hamaguchi *et al.*, 2000). PKN ist außerdem in die Signalweiterleitung vom Insulin Rezeptor zum Aktin-Zytoskelett involviert, da sich die Ausbildung von Stressfasern nach Insulin-Stimulation durch ektopische Expression von dominant negativem PKN antagonisieren lässt (Dong *et al.*, 2000). Eine direkte Beteiligung an der Regulation der Barrierefunktion von Mammaepithelien *in vivo* konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Fischer *et al.*, 2007).

Zusätzlich zu diesen Barriere-modulierenden Eigenschaften ist PKN auch an der Regulation zentraler inflammatorischer Signalwege wie den TNF-abhängigen Signalkaskaden beteiligt. So konnten Kato und Kollegen *in vivo* und *in vitro* zeigen, dass PKN direkt mit dem Tumornekrosefaktorrezeptor-assoziierten Faktor 1 (TRAF1) interagieren kann (Kato *et al.*, 2008). Dieses Protein nimmt eine Sonderstellung innerhalb der siebenköpfigen TRAF-Familie ein, da ihm die für die Aktivierung von NF- κ B und JNK notwendige RING-Finger Domäne fehlt (Ha *et al.*, 2009) und es daher inhibitorisch auf die Signaltransduktionsketten unterhalb des TNF-Rezeptors wirkt (Kato *et al.*, 2008).

1.5 Mechanismen der Regulation der epithelialen Barrierefunktion durch die proinflammatorischen Zytokine TNF und IFN

Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 erwähnt, resultieren inflammatorische Prozesse in einer fortschreitenden Zerstörung der epithelialen Barriere und diese Barriestörung führt zu einer Exazerbation der Entzündungen im Sinne eines *circulus vitiosus* (Clayburgh *et al.*, 2004) (Abbildung 1-6).

Dabei nimmt das proinflammatorische Zytokin TNF, welches in der intestinalen Mukosa von CED Patienten in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen werden konnte (Bruewer *et al.*, 2006) eine zentrale Rolle ein und ist als Angriffspunkt moderner biologischer Therapien auch von klinischer Relevanz, denn eine Reihe von Studien konnten demonstrieren, dass die Störung der epithelialen Barrierefunktion ein integraler Bestandteil der TNF-Wirkung ist und eine anti-TNF-Behandlung eine Wiederherstellung der Darmbarriere in Morbus Crohn Patienten bewirken kann (Suenart *et al.*, 2002).

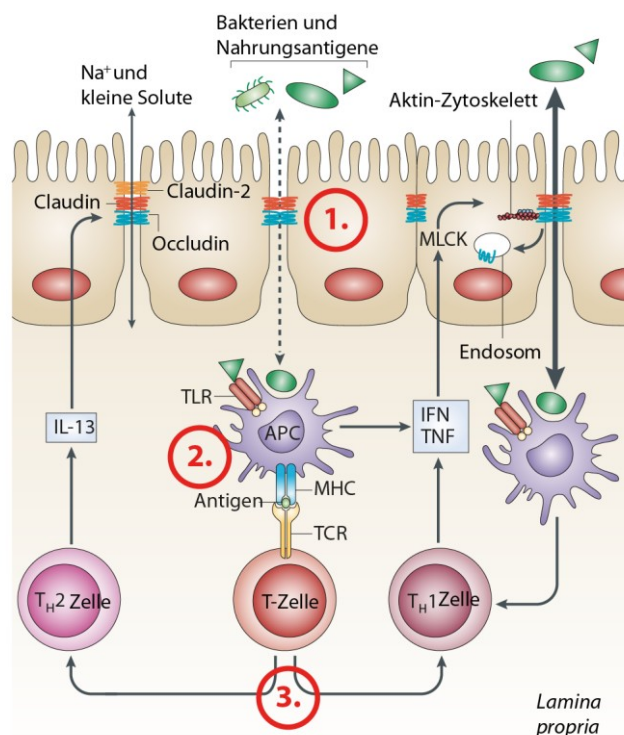


Abbildung 1-6 | Mechanismen der Zytokin-induzierten Regulation der intestinalen Barrierefunktion 1. Die intestinale Barriere muss durch Verletzungen, genetische Prädisposition oder durch Entzündungen gestört sein. 2. Durch die erhöhte Permeabilität kommt es zu einem Eindringen von Bakterien oder anderen Molekülen des Gastrointestinaltraktes in die *Lamina propria*. 3. Diese werden dann von antigenpräsentierenden Zellen (APC) registriert und nachfolgend kommt es zur Differenzierung in T_H1 oder T_H2 Zellen, welche IFN und TNF (T_H1), sowie IL-13 (T_H2) ausschütten. Diese Zytokine führen zu einer gestörten Barrierefunktion über die MLCK-vermittelte Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts und die vermehrte Expression des porenbildenden Claudin-2. TLR – *Toll-like receptor*, TCR – *T cell receptor*. Modifiziert nach (Clayburgh *et al.*, 2004; Turner, 2009).

TNF wurde erstmals 1962 als eines der 19 verschiedenen Liganden umfassenden TNF Superfamilie identifiziert (Aggarwal, 2003). Mitglieder dieser Familie vermitteln ihre Wirkung über 29 Rezeptoren, die zur TNF-Rezeptor (TNFR) Superfamilie gehören, zu denen auch TNFR1 und TNFR2 gehören (Aggarwal, 2003). TNFR1 ist ubiquitär exprimiert, TNFR2 hauptsächlich in Immun- und Endothelzellen (Aggarwal, 2003). Gelöstes TNF bindet an TNFR1 und membrangebundenes aktiviert TNFR2 (Grell *et al.*, 1995). Nach erfolgter Rezeptoraktivierung kann eine Vielzahl zellulärer Prozessen, darunter Apoptose, Proliferation und Differenzierung, über den JUN N-terminale Kinase (JNK)- (über TRAF2/MEKK1/MKK7), den p38 MAPK- (über RIP/MKK3) oder den NF- κ B-Signalweg, bei dem die I κ B Kinase (IKK) den Inhibitor von κ B (I κ B) phosphoryliert und es somit zu einer Aktivierung von NF- κ B kommt, reguliert werden (Aggarwal, 2003; Chen und Goeddel, 2002; Wajant *et al.*, 2003) (Abbildung 1-7).

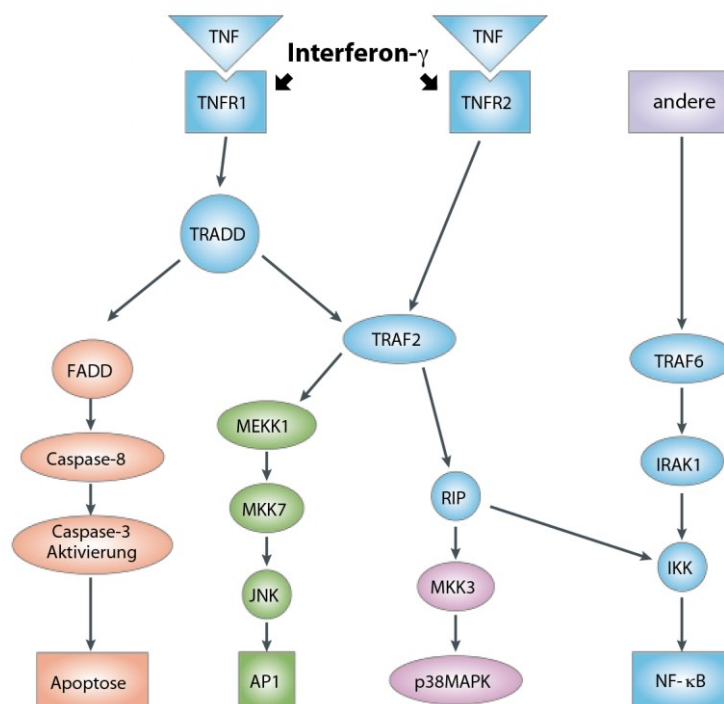


Abbildung 1-7 | TNF-aktivierte Signalwege TNF führt nach Bindung an die TNF-Rezeptoren, deren Expression durch IFN moduliert werden kann, zu einer Vielzahl an zellulären Reaktionen. Exemplarisch dargestellt sind einige der Signalwege für die eine Beteiligung an der Regulation der Barrierefunktion gezeigt werden konnte. TRADD – TNFR-associated death domain, FADD – FAS-associated death domain, MEKK1 – MAP/ERK Kinase Kinase 1, MKK7 – MAPK Kinase 7, AP1 – Aktivatorprotein 1, RIP – Rezeptor-interagierendes Protein, MKK3 – MAPK Kinase 3, IRAK1 – Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 1. Modifiziert nach (Aggarwal, 2003).

IFN ist ebenfalls ein proinflammatorisches Zytokin mit erhöhter Konzentration in der Mukosa von CED-Patienten (Bruewer *et al.*, 2006), welches hauptsächlich von Lymphozyten und

antigenpräsentierenden Zellen produziert wird und für das eine unter anderem über PI-3-Kinase- oder NF- κ B-Signalwege vermittelte Rolle bei der Ausbildung von Barrierestörungen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden konnte (Al-Sadi *et al.*, 2009). So konnte die Arbeitsgruppe um Madara 1989 zeigen, dass IFN in der Lage ist, direkt die Barriere von humane T84 Zellen zu beeinflussen, was sich in einem zeit- und dosisabhängigen Abfall des TEW und einer Erhöhung der Mannitolpermeabilität manifestierte (Madara und Stafford, 1989). Weitere Arbeiten zeigten, dass diese Barrierestörung mit einer verminderten ZO-1 Expression und Störungen der apikalen Aktinorganisation assoziiert ist (Youakim und Ahdieh, 1999).

Für TNF konnten ebenfalls barrieremodulierende Eigenschaften nachgewiesen werden. Ähnlich zu den Beobachtungen in IFN-behandelten Zellen konnte eine Erhöhung der Permeabilität gegenüber Markersubstanzen sowie eine zeit- und dosisabhängige Abnahme des epithelialen Widerstandes in humanen intestinalen HT-29/B6 Zellen gezeigt werden (Schmitz *et al.*, 1999). Trotz der bekannten proapoptotischen Wirkung beider Zytokine konnten mehrere Arbeiten zeigen, dass dies nicht die Ursache der Barrieredysfunktion ist (Bruewer *et al.*, 2003; Schmitz *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005).

Einen synergistischen Effekt hinsichtlich ihrer Barriere-schädigenden Wirkung konnte in humanen T84 und Caco-2 Zellen nachgewiesen werden (Bruewer *et al.*, 2003; Fish *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005), wobei Wang *et al.* demonstrierten, dass in Caco-2 Zellen nur nach einer 24-stündigen IFN-Vorbehandlung und anschließender basaler TNF-Gabe ein Abfall des TEW bei gleichzeitiger Zunahme der Permeabilität beobachtet werden kann (Wang *et al.*, 2005). Eine alleinige TNF-Behandlung führte in diesem Modellsystem zu keiner Schädigung der Barrierefunktion. Die molekulare Ursache für diesen Effekt liegt wahrscheinlich in der Regulation der TNF-Rezeptor 1- und 2-Expression durch IFN begründet (Janabi *et al.*, 1996; Tsujimoto *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 2006).

Einen wesentlichen Mediator diese Effekte stellt die Myosin Leichtkettenkinase (MLCK) dar, deren Expressionsniveau und Aktivität durch die Gabe von TNF zeit- und dosisabhängig erhöht wird. Als Resultat ergibt sich eine vermehrte Phosphorylierung der MLC, die mit einem Abfall des TEW sowie einer Erhöhung der parazellulären Permeabilität assoziiert ist (Ma *et al.*, 2005; Turner *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2005; Yuhan *et al.*, 1997). Untersuchungen mit einem induzierbaren Expressionssystem zeigten, dass die alleinige Expression einer konstitutiv aktiven MLCK-Mutante ausreichend für die Umstrukturierung von *tight junction* Strukturen mit der Ausbildung wellenförmiger Verformungen der Zellmembranen waren (Shen *et al.*, 2006). Für eine ursächliche Beteiligung der Myosin

Leichtkette an der Ausbildung von Barrierestörungen spricht auch die Beobachtung, dass die Gabe eines MLCK-Inhibitorpeptides (PIK) die Barrierefunktion in IFN- und TNF-behandelten T84 und Caco-2 Zellen wiederherstellen konnte (Zolotarevsky *et al.*, 2002).

Neben diesen *in vitro* Ergebnissen legen auch *in vivo* Beobachtungen eine wichtige Rolle der MLCK für die Pathogenese der CED-assoziierten Barrierestörung nahe, denn deren Expression und Aktivität ist in entzündeter Darmmukosa von Morbus Crohn Patienten erhöht und korreliert mit der Schwere der lokalen Krankheitsaktivität (Blair *et al.*, 2006).

Diese Arbeiten weisen auf die fundamentale Bedeutsamkeit der IFN- und TNF-vermittelten MLCK-Aktivierung hin, welche in einem erhöhten MLC-Phosphorylierungsniveau und damit einer erhöhten parazellulären Permeabilität resultiert. Die präzisen Abläufe, insbesondere die zwischen der Aktivierung des TNF-Rezeptors und der Myosin Leichtkettenkinase liegenden Schritte sind dabei bislang nur unvollständig aufgeklärt.

1.6 Ziel der Arbeit

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen sind Ursache einer erheblichen Morbidität und mit hohen Kosten für das Gesundheitssystem assoziiert (Prenzler *et al.*, 2011). Die Ursachen dieser komplexen Krankheiten sind bis heute nur unzureichend erforscht (Xavier und Podolsky, 2007), es konnte aber in zahlreichen Arbeiten gezeigt werden, dass die gestörte intestinale Barrierefunktion eine wichtige Rolle für die CED-Pathogenese spielt (Marchiando *et al.*, 2010; Schulzke *et al.*, 2009; Turner, 2009).

Neben einer Dysregulation der Immunantwort, welche durch eine erhöhte Sekretion proinflammatorischer Zytokine charakterisiert ist (Bruewer *et al.*, 2006; Turner, 2009), wird für die Rho-GTPase RhoA und ihren Effektor ROCK eine Beteiligung an der Ausbildung von CED vermutet, denn in entzündeter Darmmukosa von Morbus Crohn Patienten konnte eine erhöhte Aktivierung des RhoA/RhoA-assoziierte Kinase Signalweges nachgewiesen werden (Segain *et al.*, 2003). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass RhoA auch eine wesentliche Rolle bei der Regulation der epithelialen Barrierefunktion einnimmt (Ivanov *et al.*, 2010; Jou *et al.*, 1998) und dass dies unter anderem über die Modulation des MLC-Phosphorylierungsniveaus realisiert wird (Amano *et al.*, 1996; Chaturvedi *et al.*, 2011; Kimura *et al.*, 1996).

Die Signalwege, über die proinflammatorische Zytokine die Barrierefunktion regulieren, sind erst im Ansatz bekannt (Marchiando *et al.*, 2010), weshalb weiterführende Untersuchungen bedeutende Beiträge zu einem verbesserten Verständnis der molekularen Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen leisten können, die in einem nächsten Schritt bei der Entwicklung neuer Interventionsstrategien von großem Wert sein können.

Ziel dieser Arbeit war es daher, eine mögliche Beteiligung von RhoA und der RhoA Effektorkinase PKN an der TNF-induzierten Barrierestörung *in vitro* zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere der Einsatz eines induzierbaren Expressionssystem eine genauere Charakterisierung der beteiligten Moleküle ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

2.1.1.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2-1 | Verwendete primäre Antikörper Alle Antikörper wurden ÜN bei 4 °C in 5 % BSA / 0,1 % TBS-T eingesetzt.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Produktnummer	Hersteller
β-Aktin	pk Ziege	1:5000	sc-1615	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
Claudin 1	mk Maus	1:1000	374900	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Claudin 2	mk Maus	1:1000	325600	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Claudin 3	pk Kaninchen	1:1000	341700	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Claudin 4	mk Maus	1:1000	329400	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Claudin 5	mk Maus	1:1000	352500	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Claudin 7	mk Maus	1:1000	374800	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Claudin 8	pk Kaninchen	1:1000	400700Z	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Claudin 10	pk Kaninchen	1:1000	388400	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Claudin 12	pk Kaninchen	1:1000	388200	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Claudin 15	mk Maus	1:1000	329800	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
FLAG M2	mk Maus	1:40	F2426	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
GAPDH	mk Maus	1:50000	ab8245	Abcam plc, Cambridge, UK
HA-Tag	mk Maus	1:1000	2367	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D
Ik-Bα	mk Maus	1:1000	4814	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D
p-I-κBα	mk Kaninchen	1:1000	2859	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D

MLC 2	pk Kaninchen	1:1000	3672	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D
p-MLC 2	pk Kaninchen	1:1000	3671	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D
MLCK	mk Maus	1:1000	M7905	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, D
NF-κB p65	mk Kaninchen	1:1000	8242	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D
p-NF-κB p65	mk Kaninchen	1:1000	3033	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D
PKN	pk Ziege	1:250	sc-1842	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
p-PKN	pk Kaninchen	1:1000	2611	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D
ZO-1	mk Maus	1:1000	33-9100	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D

2.1.1.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 2-2 | Verwendete sekundäre Antikörper Alle Antikörper wurden für 45 min bei RT in 5 % BSA / 0,1 % TBS-T eingesetzt.

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Produktnummer	Hersteller
Ziege-HRP	Kaninchen	1:5000	P0160	Dako Deutschland GmbH, Hamburg, D
Kaninchen-HRP	Ziege	1:1000	7074	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D
Maus-HRP	Pferd	1:1000	7076	New England Biolabs GmbH, Frankfurt a.M., D
Kaninchen-AF488	Ziege	1:1000	A-11008	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
Maus-AF594	Ziege	1:1000	A-11005	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D

2.1.2 Bakterienstämme

DH5α™ Zellen

Life Technologies GmbH, Darmstadt, D

[F- Φ80*lacZ* ΔM15, Δ(*lacZYA-argF*), U169, *recA1*, *endA1*, *hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺), *phoA*, *supE44*, *thi-1*, *gyrA96*, *relA1*, *tonA*]

2.1.3 Chemikalien

Alle hier aufgelisteten Chemikalien, Salze und Lösungsmittel wurden in der Qualität „reinst“ oder „*analytic grade*“ erworben.

Aceton	Baker, Deventer, NL
Acrylamid	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Agarose	QbioGene, Mannheim, D
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Serva, Heidelberg, D
Bisacrylamid	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Bisindolymaleimid I	Merck KGaA, Darmstadt, D
BSA (<i>bovine serum albumin</i>)	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Protease- und Phosphataseinhibitoren (HALT)	Perbio Science, Pierce, Bonn, D
Coomassie Brilliant Blau G 250	Ferak, Berlin, D
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Doxozyklin	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
EDTA (Ethylendiaminotetraessigsäure)	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol	Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg, D
ExGen 500	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
G418 (Geneticin Disulfat)	Roth, Karlsruhe, D
Glycerol	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
HCl (Salzsäure)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Hoechst 33342	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D

Isopropanol	Baker, Deventer, NL
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
NaCl (Natriumchlorid)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
NaOH (Natriumhydroxid)	Roth, Karlsruhe, D
Neutralrotlösung (0,33 %)	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Nitrophenolphosphat (pNPP)	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
NP40 (Nonidet P40)	Roche, Mannheim, D
Orange G	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Paraformaldehyd (PFA)	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA
Puromycin	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Ro 31-8220	Merck KGaA, Darmstadt, D
Saponin	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck KGaA, Darmstadt, D
TEMED (N,N,N,N'-tetramethylaminomethan)	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Tricin	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Trizma [®] base	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Triton-X-100	Fluka, Deisenhofen, D
Tween 20	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Zeocin [™]	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D

2.1.4 Enzyme

T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt a.M., D
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	Promega, Mannheim, D
Restriktionsendonukleasen Typ II (EcoRV, HindIII, NotI, PmeI, PstI, SalI, XhoI)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D

2.1.5 Geräte und Zubehör

2.1.5.1 Elektrophorese- und Blotsysteme

Gelkammern für DNA-Gelelektrophorese	Biometra, Göttingen, D
Power Supply	Biometra, Göttingen, D
Gelkammern für Protein-Gelelektrophorese	Bio-Rad, München, D
<i>Semi-dry</i> -Blotter	Bio-Rad, München, D
Power Pac 200 Power Supply	Bio-Rad, München, D

2.1.5.2 Zentrifugen

Kühltischzentrifuge Biofuge fresco™	Heraeus, Hanau, D
Kühlzentrifuge Sorvall RC50 Plus	Sorvall-Instruments, Bad Homburg, D
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau, D

2.1.5.3 sonstige Geräte

Automatischer Filmentwickler Curix 60	AGFA, Deutschland, D
Brutschrank	Heraeus, Osterode, D
CO ₂ -Inkubator	Heraeus, Osterode, D
Feinwaage	Sartorius, Göttingen, D
Luminometer Sirius	TITERTEK-BERTHOLD, Pforzheim, D

Mikroskop Axio Imager.M2	Carl Zeiss AG, Jena, D
Millicell ERS Volt-Ohm Meter	Millipore GmbH, Schwalbach, D
pH-Messgerät	Radiometer, Willich, D
Photometer	Beckman, Fullerton, USA
Schüttler Rotamax 120 RM5 Assistent	Heidolph, Deutschland, D
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Osterode, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Wasserbad	Memmert, Schwabach, D

2.1.5.4 Zubehör und Software

Chromas Lite	Technelysium Pty Ltd, Brisbane, AUS
Filme (Kodak Biomax ML)	Kodak, Rochester, New York, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego, USA
Hybond-P PVDF Membran	Amersham-Pharmacia, Freiburg, D
Hyperscreen™	Amersham-Pharmacia, Freiburg, D
Klonierungszyylinder	Sigma-Aldrich GmbH, München, D
Transwell® Filter Inserts (12 Well)	Corning Inc., Corning NY, USA
Whatman Filterpapier	BioRad, München, D
Zellkulturmaterialien	Sarstedt AG & Co., Nürnberg, D

2.1.6 Kits

BCA™ Protein Assay Reagent	Perbio Science, Pierce, Bonn, D
Luziferase Assay System	Promega, Mannheim, D
G-Lisa™ small G-Protein Activation Assay	Cytoskeleton Inc., Dever, USA
MycoAlert® Kit	Lonza, Rockland, USA

NucleoSpin® Plasmid (Mini-Prep)	Machery-Nagel, Düren, D
NucleoBond® Xtra Midi EF (Midi-Prep)	Machery-Nagel, Düren, D
ProLong® Antifade Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, D
QIAquick® Gel Extraktion Kit	Qiagen, Hilden, D
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, D

2.1.7 Lösungen

Der Begriff H₂O steht grundsätzlich für *aqua bidest*, welches mittels einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore GmbH aufbereitet wurde.

A

AB-3 Stocklösung für Tricin-SDS-PAGE

48 g Acrylamid

1,5 g Bisacrylamid

auf 100 ml mit H₂O auffüllen

Alkalische Phosphatase Puffer

100 mM Tris-HCl pH 9,5

100 mM NaCl

50 mM MgCl₂

Alkalische Phosphatase Lysepuffer

10 mM Tris-HCl pH 7,4

20 µM ZnCl₂

1 mM MgCl₂

0,02 % Triton X-100

Ampicillin-Stammlösung (1000x)

5 g Ampicillin auf 50 ml mit H₂O auffüllen,

steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C

Anodenpuffer für Tricin-SDS-PAGE (10x)

1 M Tris

0,225 M HCl

pH-Wert auf 8,9 einstellen

B

Blockierlösung Western-Blot

5 g BSA auf 100 ml mit H₂O auffüllen

Blockier- und Verdünnungspuffer (IF)

1 ml PBS (10x)

1 g BSA

5 mg Saponin	Gelpuffer für Tricin-SDS-PAGE (3x)
auf 10 ml mit H ₂ O auffüllen	3 M Tris
	1 M HCl
C	0,3 % SDS
Coomassie-Lösung für Polyacrylamidgel	pH-Wert auf 8,45 einstellen
0,8 g Coomassie brilliant blue R250	
200 ml Methanol	K
200 ml H ₂ O	Kathodenpuffer für Tricin-SDS-PAGE (10x)
40 ml Eisessig	1 M Tris
	1 M Tricin
E	1 % SDS
Elektrodenpuffer für Tricin-SDS-PAGE (semi-dry Transfer)	pH-Wert auf 8,25 einstellen
0,3 M Tris	
0,1 M Eisessig	L
pH-Wert auf 8,6 einstellen	LB-Agarplatten mit Ampicillin
	15 g Agar
Entfärberlösung nach Coomassiefärbung	1 l LB-Medium
25 % Methanol	autoklavieren, nach Abkühlung auf ca. 50 °C
10 % Eisessig	mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzen und die
65 % H ₂ O	Platten sofort gießen
Ethidiumbromid-Stammlösung	LB-Medium
1 g Ethidiumbromid auf 100 ml H ₂ O auffüllen	10 g Bactotryptone
	5 g Bacto-Yeast Extrakt
G	5 g NaCl

in 1 l H₂O lösen und autoklavieren

PBS (10 x)

400 g NaCl

Ladepuffer (Für DNA-Agarosegele)

10 g KCl

30 ml Glycerol

57,5 g Na₂HPO₄·2H₂O

250 mg Bromphenolblau

10 g KH₂PO₄

250 mg Xylencyanol

in ca. 3 l H₂O lösen, autoklavieren und mit

250 mg Orange G

autoklaviertem H₂O auf 5 l auffüllen

auf 100 ml mit TAE-Puffer auffüllen

Penicillin/Streptomycin-Lösung

100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin

Lysispuffer Proteinextraktion (RIPA)

0,05 M Tris pH 7,5

PFA-Arbeitslösung

0,15 M NaCl

1 ml PFA-Stocklösung (10 %)

1 % NP40

1 ml PBS (10x)

0,5 % Natriumdesoxycholat

8 ml H₂O

0,1 % SDS

HALT Protease und Phosphatase Inhibitor

10 µl 1 M CaCl₂, schnell vermischen

Cocktail (100x)

PFA-Stocklösung

N

1 g PFA

Neutralrot-Entfärbelösung

10 ml H₂O

10 ml Ethanol (96 %)

aufkochen, danach 10 µl 10 N NaOH zugeben

10 ml H₂O

0,2 ml Eisessig

Probenpuffer für Tricin-SDS-PAGE

(reduzierend; 4x)

P

0,15 M Tris pH 7

12 % SDS

TBS (10x)

30 % Glycerol	60,57 g Tris
6 % β -Mercaptoethanol	90 g NaCl
0,05 % Coomassie brilliant blue R250	auf 1 l mit H ₂ O auffüllen
aliquotiert bei –20 °C lagern	
	TBS-T (0,2 %)
Q	998 ml TBS
Quenching Puffer (IF)	2 ml Tween-20
10 ml PBS (10x)	
5 ml 1 M NH ₄ Cl	Triton/Glycerol Lysepuffer
85 ml H ₂ O	1 ml Triton X-100
100 μ l 1 M CaCl ₂	10 ml Glycerol
S	0,8766 g NaCl
Stripping-Puffer (Western-Blot)	2 ml 1 M Tris (pH 7,5)
0,1 M NaOH	400 μ l 0,5 M EDTA
2 % SDS	1 ml HALT Protease und Phosphatase Inhibitor
0,5 % DTT	Cocktail (100x)
	auf 100 ml mit H ₂ O auffüllen
T	
TAE-Puffer (50x) für die Agarose-	W
Gelelektrophorese	Waschpuffer (IF)
242,28 g Tris	10 ml PBS (10x)
57,1 ml Eisessig	3 g BSA
100 ml 0,5 M EDTA-Stammlösung (pH 8,0)	50 mg Saponin
auf 1 l mit H ₂ O auffüllen	87 ml H ₂ O

2.1.8 Marker

Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon Rot, D
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas GmbH, St. Leon Rot, D
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon Rot, D

2.1.9 Vektoren und Plasmide

pBI-L (#631005)	Clontech Laboratories, Inc., CA, USA
Linear Puromycin Marker (#631626)	Clontech Laboratories, Inc., CA, USA
pcDNA3.1-RhoAG14V	Missouri S&T cDNA Res. C., Rolla, USA

2.1.10 Zelllinien

Caco-2 (ATCC® Nummer: HTB-37™)

Die humane Kolonkarzinom-Zelllinie Caco-2 wurde aus einem Kolontumor eines 72-jährigen Mannes etabliert und aus dieser Linie konnte ein Subtyp (Caco-2_{BBE}) isoliert werden, der die Fähigkeit zur spontanen Differenzierung nach dem Erreichen der Konfluenz besitzt. Die Ausbildung eines apikalen Bürstensaums und die Expression der entsprechenden Bürstensaumenzyme charakterisieren diese Zellen, die damit das relevanteste *in vitro* Modell für Untersuchungen der Vorgänge bei der Differenzierung und Regulation von intestinalen Funktionen darstellen. Nach einer etwa 14-21-tägigen Differenzierungsphase sind Caco-2 Zellen mit humanen Enterozyten vergleichbar (Chaturvedi *et al.*, 2011; Jumarie und Malo, 1991; Meunier *et al.*, 1995; Sambuy *et al.*, 2005).

Die für die Etablierung eines induzierbaren Expressionssystems notwendigen Caco-2 Zellen waren bereits erfolgreich mit dem Regulatorprotein tTA (Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator) transfiziert und wurden von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Jerrold R. Turner (University of Chicago, USA) zur Verfügung gestellt (Caco-2_{BBE}/5E6L/Klon 4C4).

T84 (ATCC® Nummer: CCL-248™)

Die humane Kolonkarzinom-Zelllinie T84 wurde aus einer Lungenmetastase eines Kolontumors eines 72-jährigen Mannes etabliert. Ähnlich wie Caco-2 Zellen weisen T84

Zellen Eigenschaften von nicht transformierten intestinalen Epithelzellen auf. Bei Erreichen der Konfluenz kommt es zur Ausbildung einer Polarität, *tight junctions*, Desmosomen und Mikrovilli. Anders als bei Caco-2 Zellen ist eine zwei- bis dreiwöchige Differenzierungsphase nicht notwendig (Dharmasathaphorn *et al.*, 1984).

2.1.11 Zytokine

Interferon- γ (#8901)	New England Biolabs, Frankfurt a.M., D
Tumornekrosefaktor α (#8902)	New England Biolabs, Frankfurt a.M., D

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten ist mit Hilfe eines elektrischen Feldes aufgrund des negativ geladenen Phosphat-Rückgrates möglich, wobei sich bei linearisierter DNA größere Fragmente langsamer als kleinere bewegen.

Für die Analyse der erhaltenen DNA-Fragmente wurden 1 % Agarose-Gele (in 1 x TAE-Puffer gelöst) verwendet. Zur Visualisierung der DNA wurde dieses Gemisch mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,2 µg/ml) versetzt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6 x Ladepuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Ein simultan eingesetzter Längenstandard diente der Größenbestimmung. Der Gelelektrophoreselauf erfolgte bei einer Spannung von 100 V (in 1 x TAE-Puffer) für 45 Minuten in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer.

2.2.1.2 DNA-Fragmentisolation

Eine Agarose-Gelelektrophorese wurde auch zur Auftrennung und Reinigung von DNA-Fragmenten im präparativen Ansatz durchgeführt. An die Auftrennung von linearisierten Plasmiden anschließend, wurde das für weitere Schritte benötigte DNA-Fragment mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mit dem QIAquick® Gel Extraction Kit gemäß Herstellerangaben extrahiert.

2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel wurde, gemäß der Herstellerangaben, Plasmid-DNA aus *E.coli* präpariert. Zur Gewinnung größerer Mengen an DNA wurde alternativ das NucleoBond® Xtra Midi EF Kit vom gleichen Hersteller verwendet. Die verwendeten Produkte basieren auf dem von Birnboim und Doly beschriebenen Verfahren zur Isolation von rekombinanter Plasmid-DNA aus Bakterien (Birnboim und Doly, 1979).

Für die initiale Charakterisierung der rekombinanten Bakterienklone wurden 3 ml LB-Medium mit einer positiven, auf LB-Agarplatten gewachsenen, Kolonie angeimpft und bei 37 °C ÜN im Schüttler inkubiert. Die anschließende Präparation der Plasmid-DNA erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die für alle Transfektionsansätze notwendige Reinheit der DNA, sowie die Gewinnung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurden durch die

Verwendung des NucleoBond® Midi-Kits sichergestellt. Dazu wurden jeweils 100 ml an LB-Medium mit 1 ml von positiven ÜN-Kulturen versetzt und erneut für etwa 16 Stunden bei 37 °C im Bakterienschüttler inkubiert.

Eine Agarose-Gelelektrophorese diente der Überprüfung der erfolgreichen Plasmid-Isolation.

2.2.1.4 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung

Die Nukleinsäurekonzentrationen wurden durch Messungen der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge in einem Photometer bestimmt. Dabei stellt das Verhältnis der Extinktionen OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ ein Maß für die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren dar und sollte bei DNA zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Eine OD₂₆₀ von 1 ist bei der Messung mit einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger DNA oder RNA gleichzusetzen.

2.2.1.5 Restriktion von DNA

Die *in vitro*-Spaltung von DNA mit Hilfe von Typ II Restriktionsendonukleasen ermöglicht das Auftrennen doppelsträngiger DNA an spezifischen Stellen innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz, wobei entweder glatte oder überhängende Enden entstehen können. Es wurden sowohl präparative (zur Durchführung der Klonierungen) als auch analytische Restriktionen (Charakterisierung von Bakterienklonen 2.2.1.9) im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt.

Die Bedingungen für die durchgeführten Restriktionen mit einem Enzym sind in Tabelle 2.3 zu finden.

Tabelle 2-3 | Durchgeführte Einzel-Restriktionsverdau-Ansätze

	PmeI	EcoRV	PstI
Puffer	1 µl Puffer B	1 µl Puffer R	1 µl Puffer O
Enzym	1 µl PmeI	1 µl EcoRV	1 µl PstI
Plasmid-DNA (2 µg)	6,9 µl	2,4 µl	1 µl
H₂O	1,1 µl	5,6 µl	7 µl
Gesamtansatz	10 µl	10 µl	10 µl

Die für den simultanen Einsatz von zwei Restriktionsenzymen notwendigen Bedingungen wurde mit Hilfe des *DoubleDigest*TM Programmes der Firma Fermentas ermittelt und sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2-4 | Durchgeführte Doppel-Restriktionsverdau-Ansätze

	HindIII/XhoI	HindIII/Sall	NotI/XhoI	NotI/Sall
Puffer	1 µl Puffer R	4 µl 2x Tango TM	3 µl Puffer O	2 µl Puffer O
1. Enzym	1 µl HindIII	2 µl HindIII	1 µl NotI	1 µl NotI
2. Enzym	1 µl XhoI	2 µl Sall	2 µl XhoI	1 µl Sall
Plasmid-DNA (2 µg)	1,2 µl	2,4 µl	1,8 µl	2,4 µl
H₂O	15,8 µl	29,6 µl	23,2 µl	13,6 µl
Gesamtansatz	20 µl	40 µl	30 µl	20 µl

2.2.1.6 Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung der Religation von linearisierten Vektoren mit komplementären bzw. glatten Enden wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (AP) entfernt.

Für diese Dephosphorylierung wurden jeweils 3 µg des linearisierten Vektors mit 3 µl 10x SAP-Puffer und mit 3 µl (3 Units) AP inkubiert. Nach 20 Minuten bei 37 °C wurde der Ansatz für 20 Minuten auf 65 °C erhitzt, was eine Inaktivierung der AP zur Folge hatte.

Um den dephosphorylierten Vektor für weitere Klonierungsschritte benutzen zu können, wurde der Ansatz mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit gemäß der Herstellerangaben aufgereinigt.

2.2.1.7 Ligation von DNA

Zur Generierung der fertigen Plasmide wurden linearisierte Vektor-DNA und das jeweilige Zielgen-Fragment (siehe Abschnitt 3.2.1) unter Verwendung der T4-DNA-Ligase ligiert. Diese katalysiert die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 5'-Phosphat- und gegenüberliegenden freien 3'-Hydroxylgruppen. Die einzusetzenden DNA-Mengen wurden mit nachfolgender Formel errechnet (T4-DNA-Ligase Handbuch, Promega):

$$\frac{ng \text{ Vektor} \cdot kb \text{ (Größe des Inserts)}}{kb \text{ (Größe des Vektors)}} \cdot \text{molares Verhältnis von } \frac{\text{Insert}}{\text{Vektor}} = ng \text{ (Insert)}$$

Ein molares „Vektor zu Insert“-Verhältnis von 1:3 wurde bei der Herstellung aller pBI-L-Konstrukte angewandt. Der für alle in dieser Arbeit durchgeführten Ligationen verwendete Ansatz ist in Tabelle 2.5 dargestellt.

Tabelle 2-5 | Verwendeter Ligationsansatz

10x Ligationspuffer	1 µl
Insert (3-fache Vektormenge)	x µl
Vektor	y µl
T4-DNA-Ligase (1 Weiss unit)	1 µl
H ₂ O	auf 10 µl auffüllen
Gesamtansatz	10 µl

Der Ansatz wurde nachfolgend bei 16 °C ÜN inkubiert. Eine Ligationskontrolle, bei der der dephosphorylierte Vektor ohne Insert im Ligationsansatz verwendet wurde, diente als Effizienzkontrolle des Dephosphorylierungsschrittes (siehe 2.2.1.6). Nach Transformation dieses Ansatzes (siehe 2.2.1.8) sollten keine Bakterienkolonien nachzuweisen sein.

2.2.1.8 Transformation kompetenter *E.coli* Bakterien

Nach erfolgter Ligation wurde 20 µl KCl in den Ansatz gegeben und dieser anschließend auf 100 µl mit H₂O aufgefüllt. Dieser DNA/KCl-Mix wurde zusätzlich mit 100 µl kompetenter *E.coli* Bakterien (siehe 2.1.2) versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur und das erneute Abkühlen des Ansatzes auf 4 °C für 5 Minuten. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und einer einstündigen Inkubation bei 37 °C in einem Bakterenschüttler wurden 50 µl Bakterien auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. In einem Konzentrationsschritt wurden die restlichen 1150 µl bei 6000 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen von 950 µl des Überstandes folgte die Resuspension des Bakterien-Pellets in den restlichen 200 µl und ein erneutes Ausplattieren auf LB-Ampicillin-Agarplatten, welche anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden. Die Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgte durch das Auszählen der Kolonien nach circa 16 Stunden.

2.2.1.9 Charakterisierung rekombinanter Klone

Aus den erfolgreich transformierten und somit auf LB-Ampicillin-Agarplatten wachsenden Bakterien erfolgte die Isolation von Plasmid-DNA (siehe 2.2.1.3), welche anschließend mit Restriktionsendonukleasen gespalten wurde (siehe 2.2.1.5). Dieses Vorgehen ermöglichte die Überprüfung der erfolgreichen Insertion und der korrekten Orientierung des jeweiligen DNA-Fragmentes. Eine Sequenzierung (siehe 2.2.1.10) der positiven Klone diente dem Ausschluss von Punktmutationen und der Überprüfung der Vollständigkeit von inserierten Fragmenten.

2.2.1.10 DNA-Sequenzierung

Bei der als Didesoxyverfahren (auch Kettenabbruch-, oder Terminatorverfahren) bezeichneten DNA-Sequenzierung wird die zu sequenzierende DNA denaturiert und nachfolgend mit einem Sequenzierungsprimer hybridisiert, welcher anschließend mit einer DNA-Polymerase verlängert wird. Sobald ein 2',3'-Didesoxynukleotid eingebaut wird, bricht die Elongation aufgrund der fehlenden OH-Gruppe am 3'-C-Atom ab. Die Markierung aller vier Didesoxynukleotide mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die Identifizierung der erhaltenen DNA-Sequenz nach Auftrennung der entstandenen Fragmente anhand der Fluoreszenzsignale (Sanger *et al.*, 1977).

Alle während dieser Arbeit notwendigen Sequenzierungen wurden von einem externen Sequenzierlabor durchgeführt (Sequenzierservice ABI373 BigDye-Terminator-Chemie; Dr. M. Meixner; DLMBC, Dienstleistungen in der Molekularbiologie). Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe der Chromas Lite Software am Computer analysiert.

2.2.1.11 Kultivierung von *E.coli*

Transformierte *E.coli* Bakterien (siehe 2.2.1.8) wurden in Ampicillin-haltigem (100 µg/ml) LB-Medium bei 37 °C über Nacht in einem Bakterienschüttler inkubiert. Das Anlegen von Glycerolkulturen (15 % Glycerol Endkonzentration) ermöglichte die längerfristige Aufbewahrung bei - 80 °C.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Proteinisolierung aus Zellen

Für die Gesamtprotein-Isolierung wurden Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen und anschließend mit RIPA-Lysepuffer für 20 Minuten bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert.

Eine Homogenisierung des Zelllysates erfolgte durch mehrmaliges pipettieren. Um überflüssige Zellreste zu pelletieren wurde das Lysat bei 4 °C und 13 000 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und bei -80 °C für die weitere Verwendung aufbewahrt.

2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCATM Protein Assay Reagent Kit

Vor der Verwendung der Zelllysate (siehe 2.2.2.1) wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe des BCATM Protein Assay Reagent Kit (Perbio Science, Pierce, Bonn, D) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden BCA Reagenz A und B in einem 1:50 Verhältnis gemischt und zu den zu messenden Proben gegeben. Während der 30-minütigen Inkubation bei 60 °C fand ein proteinkonzentrationsabhängiger Farbumschlag statt, welcher mit einem Photometer gemessen werden konnte. Proben mit bekannten Proteinkonzentrationen dienten der Erstellung einer Standardkurve, mit der die Berechnung des Proteingehaltes der untersuchten Proben durchgeführt werden konnte.

2.2.2.3 Tricin-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Tricin-SDS-PAGE)

Proteine können gelelektrophoretisch aufgrund ihres Molekulargewichtes mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt werden (Laemmli, 1970), bei der die zu analysierenden Proteine mit β -Mercaptoethanol oder DTT reduziert und durch SDS sowie hohe Temperaturen denaturiert werden. Die dabei entstandenen negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis unterscheiden sich nur hinsichtlich ihrer Größe. Das Trenngel wird entsprechend des Molekulargewichtes der gesuchten Proteine angepasst und liegt größtenteils zwischen 5 und 15 %. Gegenüber der normalen SDS-PAGE ermöglicht die zusätzliche Verwendung von Tricin im Kathodenpuffer eine noch feinere Auftrennung der untersuchten Proteine in einem Größenbereich von 1 – 100 kDa (vgl. Abbildung 2-1A und B) (Schagger, 2006).

Die Proteinproben wurden mit der entsprechenden Menge an reduzierendem 4 x Probenpuffer versetzt und bei 37 °C für 15 Minuten erhitzt. An die Denaturierung anschließend folgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei einer Stromstärke von etwa 70 mA (30 - 200 V) für circa 3 Stunden in einer vertikalen Gelelektrophoresekommer. Ein Molekulargewichts-Längenstandard, der den erwarteten Größenbereich abdeckte, wurde zusätzlich mit aufgetragen. Nach Abschluss der Auftrennung folgte das Immunoblotting (siehe 2.2.4.1).

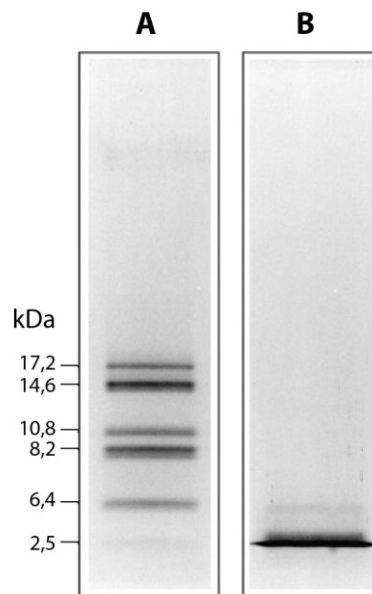


Abbildung 2-1 | Vergleich Tricin-SDS-PAGE und SDS-PAGE A) Tricin-SDS-PAGE mit einem 10-prozentigem Trenn- und einem 3-prozentigem Sammelgel. B) SDS-PAGE nach Laemmli mit einem 10-prozentigem Trenn- und einem 3-prozentigem Sammelgel. Modifiziert nach (Schagger, 2006).

2.2.2.4 Stripping-Protokoll für Western-Blots

Um bereits verwendete PVDF-Membranen erneut für die Inkubation mit alternativen Antikörpern zu benutzen, wurden diese mit Hilfe eines Stripping-Puffers behandelt. Vor der Durchführung des Stripping-Protokolls wurde verbleibende ECL-Lösung von der Membran gewaschen (3 x 5 Minuten TBS-T (0,2 %)). Eine ausreichende Menge an Puffer (10 ml) wurde nachfolgend zusammen mit der zu behandelnden Membran für 60 Minuten bei 55 °C inkubiert. Anschließend folgten 6 fünfminütige Waschschrte in TBS-T (0,2 %). Die weiteren Schritte wurden entsprechend 2.2.4.1 durchgeführt.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung der eukaryontischen Epithelzelllinien Caco-2 und T84

Parentale, bereits tTA transfizierte, Caco-2 Zellen wurden in geeignetem Medium (High glucose D-MEM-Komplettmedium (Gibco #10569-010) mit 1-prozentiger Penicillin/Streptomycin-Lösung, 1 % nicht essentiellen Aminosäuren, 10 mM Hepes, 250 µg/ml G418, 50 µg/ml Zeocin™ und 10 % FBS) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Erreichen einer 80-prozentigen Konfluenz wurden die Zellen in eine neue Kulturflasche überführt. Die Zellen wurden dafür nach Waschen mit PBS mit Trypsin versetzt und für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinierung wurde mit Komplettmedium gestoppt und die Zellen in einem Verhältnis (Zellsuspension zu neuem

Komplettmedium) von 1:10 ausgesät. Nach fünf Tagen erreichten die Zellen erneut eine 80-prozentige Konfluenz. T84 Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen kultiviert und passagiert; als Kulturmedium wurde jedoch ein 1:1 Verhältnis von D-MEM- und Ham's F-12-Medium (Gibco #10565-018) verwendet.

2.2.3.2 Stabile Transfektion von eukaryontischen adhärennten Caco-2 Zellen

Der von unserem Kooperationspartner Prof. Turner zur Verfügung gestellte Caco-2 Zellklon wurde für die Etablierung eines stabil transfizierten induzierbaren Expressionssystems verwendet. Für die durchgeführten Transfektionen kam das ExGen 500 *in vitro* Transfektionsreagenz der Firma Fermentas zum Einsatz. 24 Stunden vor der Transfektion wurden 5×10^5 Caco-2 Zellen in einer 6 Well-Platte ausgesät, so dass am nächsten Tag eine Konfluenz von etwa 60 bis 70 % erreicht wurde. Für die Transfektion wurden 2,85 µg Plasmid sowie 150 ng linearer Puromycin Marker in 200 µl 150 mM NaCl-Lösung verdünnt und anschließend wurden 10 µl ExGen Reagenz zu der DNA/NaCl-Lösung gegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurde das DNA/ExGen-Gemisch auf die Zellen pipettiert und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein Mediumswechsel und nach erneuter 24-stündiger Inkubationsphase wurden die transfizierten Zellen trypsinisiert und auf einer 10 cm Schale mit dem zusätzlichen Selektionsantibiotikum Puromycin (1 µg/ml) kultiviert. Die für die Selektion notwendige Antibiotikumskonzentration war zuvor mit Hilfe einer sogenannten *killing curve* ermittelt worden, bei der die Wirkung von unterschiedlichen Konzentrationen (0,25 µg/ml bis 5 µg/ml Puromycin) auf die Überlebensfähigkeit der Zellen untersucht wurde. Nach etwa zwei bis drei Wochen Selektionszeit bildeten sich Einzelzellklone, welche mit Hilfe von Klonierungszyklindern der Firma Sigma-Aldrich separiert wurden. Für die anschließenden Expressionsanalysen wurden die einzelnen Klone nach einer initialen Wachstumsphase dreigeteilt, das heißt jeweils in zwei Wells einer 12-Well Platte (Medium mit 100 ng/ml) und ohne Doxzyklin) und zugleich in einem Well einer 6-Well Platte (mit 100 ng/ml Doxzyklin) kultiviert. Nach 48 Stunden wurde die Zielgenexpression anhand der jeweiligen Luziferase-Expression bzw. -Aktivität (siehe 2.2.3.4) bestimmt. Nur Zellklone mit einer niedrigen basalen Luziferase-Expression (Medium mit Doxzyklin) und einer hohen Expression nach Doxzyklin-Entnahme wurden für weiterführende Experimente berücksichtigt.

2.2.3.3 Induktion der RhoA- bzw. PKN-Expression

Während der regulären Kultivierung wurde das Medium für induzierbare Zellen mit 100 ng/ml Doxzyklin versetzt. Zum Induzieren der jeweiligen Transgenexpression wurden die Zellen zweimal mit angewärmtem PBS und einmal mit D-MEM gewaschen. Anschließend bekamen die zu induzierenden Zellen Doxzyklin-freies D-MEM Komplettmedium inklusive der Selektionsantibiotika. Bei der initialen Charakterisierung der generierten Zellklone wurden die Zellen für 48 Stunden in Induktionsmedium kultiviert.

2.2.3.4 Bestimmung der Luziferase-Aktivität mit Hilfe eines Reporterassays

Für die Bestimmung der Luziferase-Expression nach Induktion der induzierbaren Zellklone wurde das „Luziferase Assay System“ der Firma Promega gemäß der Herstellerangaben verwendet.

Nach Abschluss der Induktionsphase (siehe 2.2.3.3) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellen mit Hilfe des passiven Lysepuffers der Firma Promega lysiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf einem Schüttler bei Raumtemperatur wurden die Zellen bei -80 °C eingefroren und anschließend wieder aufgetaut. Die Luziferase-Expression bzw. –Aktivität und die daraus nach Zugabe von 100 µl Luziferase-Substrates resultierende Lichtemission wurde mit Hilfe eines Luminometers der Firma Titertek-Berthold gemessen.

2.2.3.5 Mycoplasmentest

Eine Überprüfung auf Mycoplasmen-Kontamination erfolgte mit Hilfe des MycoAlert[®] Mycoplasmen Detektions Kits der Firma Lonza.

Zwei Milliliter Zellkulturmedium von zu untersuchenden Zellkulturen wurden nach einer einwöchigen Inkubationsphase im Brutschrank entnommen und für 15 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Anschließend wurden 100 µl vom Überstand mit 100 µl MycoAlert[®] Reagenz versetzt. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurde die emittierte Lichtmenge im Luminometer der Firma Titertek-Berthold gemessen. Nach der Zugabe von 100 µl MycoAlert[®] Substrates folgte eine erneute Messung und die Berechnung des Verhältnisses von Messung 2 / Messung 1. Werte unter 1 signalisierten einen Mycoplasmen-negativen Befund, denn nur wenn bestimmte Myoplasmen-spezifische Enzyme im Überstand vorhanden sind, kommt es zu einer erhöhten ADP zu ATP Umwandlung nach Zugabe des MycoAlert[®] Substrates.

2.2.3.6 Bestimmung der Zellviabilität

Die Zellviabilität von Inhibitor-behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde mit Hilfe des Neutralrot-Aufnahmetests bestimmt (Repetto *et al.*, 2008). Dabei wurden die zu untersuchenden T84 Zellen in einer 96-Well Platte ausgesät und nach Abschluss der Behandlung mit 100 µl eines Neutralrot-Lösung/Zellkultur-Medium Gemisches (1:100) für 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach passiver Diffusion durch die Zellmembran reichert sich das Gemisch nur in den Lysosomen von viablen Zellen an, da nur diese einen Protonengradienten gegenüber dem Zytoplasma aufrecht erhalten können, wodurch die Neutralrot-Substanz ionisiert und in diesem Kompartiment festgehalten wird. Anschließend wurden die Zellen mit 150 µl PBS pro Well gewaschen und das aufgenommene Neutralrot durch Zugabe einer Entfärbelösung, sowie durch zehnminütiges Schütteln aus den Zellen extrahiert. Die Absorption der Neutralrotextakte bei 540 nm wurde in einem Photometer bestimmt und diente in einem letzten Schritt der Berechnung der Zellviabilität.

2.2.3.7 Aktivitätsbestimmung der alkalischen Phosphatase (AP)

In Caco-2 Zellen ist mit zunehmendem Differenzierungsgrad eine vermehrte Expression der membranständigen AP, welche als Differenzierungsmarker in Kolonkarzinomzellen gut etabliert ist (Matsumoto *et al.*, 1990; Sambuy *et al.*, 2005), zu detektieren. Eine Expressionserhöhung im Vergleich zu undifferenzierten Kontrollzellen kann über die Aktivitätsbestimmung der AP, welche die Abspaltung einer Phosphatgruppe und den damit verbundenen Farbumschlag katalysiert, mit Hilfe einer kolorimetrischen Untersuchung bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt werden. Dazu wurden Zellen mit AP-Lysepuffer lysiert und für 5 Minuten bei 13000 g zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden für den Test mit 50 µl p-Nitrophenolphosphat (pNPP) für 60 Minuten bei 25 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe einer Stoplösung beendet. Danach wurde die Absorption des gelblich gefärbten p-Nitrophenols (pNP) bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt. Für die folgenden Berechnungen wurde die Absorption einer Hintergrundkontrolle (H₂O) von den untersuchten Proben abgezogen.

2.2.3.8 Bestimmung der RhoA-Aktivität

Die Aktivität des konstitutiv aktiven RhoA exprimierenden Zellklons wurde mit Hilfe des „G-Lisa™ small G-Protein Activation Assay“ der Firma Cytoskeleton untersucht. Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung von aktivem RhoA, welches an eine immobilisierte Rho-

Bindungsdomäne bindet und in späteren Schritten durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers detektiert werden kann.

Alle untersuchten Gruppen wurden für 24 Stunden in 0,5 % FBS-haltigem Hungermedium mit Doxyzyklin (100 ng/ml) kultiviert und anschließend folgte in zwei untersuchten Gruppen eine 48-stündige Induktionsphase, während der das Doxyzyklin aus dem Medium entzogen wurde. Nach Abschluss der Induktion wurden die Zellen mit 4 °C kaltem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Kulturgefäß gelöst und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bestimmung der RhoA-Aktivität erfolgte dann entsprechend der Herstellerangaben des „G-Lisa™ small G-Protein Activation Assay“.

Zusätzlich zu dem pBI-L-RhoA wurden die nicht RhoA-transfizierten Parentalzellen (der tTA exprimierende Klon 4C4) als Kontrollgruppe untersucht.

2.2.4 Immunologische Methoden

2.2.4.1 Immunoblotting

An die gelelektrophoretische Auftrennung (siehe 2.2.2.3) anschließend wurden die Proteine entsprechend der von Towbin beschriebenen Methode auf eine PVDF-Membran transferiert (Towbin *et al.*, 1979). Aufgrund hydrophober Interaktionen verbleiben die Proteine an dieser Membran und können in nachfolgenden Schritten mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Für den Proteintransfer kam ein nach (Schagger, 2006) abgewandeltes *semi-dry*-Verfahren zum Einsatz, bei dem die PVDF-Membranen nach dem Benetzen mit Methanol sowie 6 mm Whatman Chromatographie Papier und die Tricin-SDS-PAGE-Gele für 10 Minuten in Elektrodenpuffer inkubiert wurden. Nach dem ordnungsgemäßen Zusammensetzen (siehe Abbildung 2-2) des „Immunoblot-Stapels“ erfolgte der Transfer in einem *semi-dry*-Blotter der Firma BioRad bei einer konstanten Stromstärke von 0,4 mA/cm² für 16 Stunden.

Nach Abschluss des Proteintransfers wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen durch eine 30-minütige Inkubation mit einer Blockierlösung (5 % BSA / 0,1 % TBS-T) gesättigt. Der jeweilige primäre Antikörper wurde in der Blockierlösung angesetzt und anschließend erfolgte eine Übernacht-Inkubation bei 4 °C auf einem Rollenschüttler. Ein daran anschließender Waschschritt (6 x 5 Minuten) mit TBS-T (0,2 %) entfernte nichtgebundene Antikörper. Die Inkubation mit einem entsprechenden in Blockierlösung angesetzten sekundären Antikörper wurde für 45 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach einem abschließenden Waschschritt mit 0,2 % TBS-T (6 x 5 Minuten) wurde der Blot für eine

Minute mit dem ECL-Substrat der Firma Amersham-Pharmacia (1:1 Verhältnis von ECL1 und ECL2) behandelt.

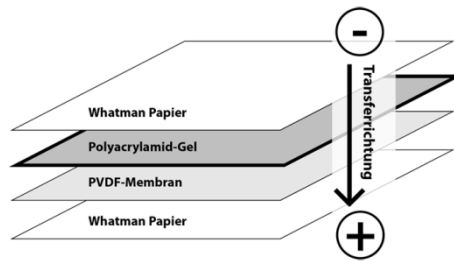


Abbildung 2-2 | Semi-dry-Transfer Dargestellt ist der in der Arbeit verwendete *semi-dry*-Transfer-Aufbau. Alle Komponenten wurden in Elektrodenpuffer für 10 Minuten äquilibriert (die PVDF-Membran wurde vorher mit Methanol benetzt) und gemäß der Darstellung angeordnet. Der Transfer erfolgte in einem *semi-dry*-Blotter der Firma BioRad bei einer konstanten Stromstärke von $0,4 \text{ mA/cm}^2$ für 16 Stunden.

Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysiert die Umsetzung dieses Substrates, bei der Lichtquanten einer Wellenlänge von 425 nm emittiert werden. Die Detektion dieses emittierten Lichtes ermöglichte ein lichtempfindlicher Film der Firma Kodak.

2.2.4.2 Immunpräzipitation

Der direkte Nachweis von PKN nach Induktion der Expression (siehe 2.2.3.3) war aufgrund der limitierten Spezifität anti-FLAG-Antikörpers nicht möglich, weshalb eine FLAG-Immunpräzipitation durchgeführt wurde.

Dafür wurden PKN KA und DN exprimierende Zellen in T75 Zellkulturflaschen ausgesät und nach dem Erreichen einer 70-prozentigen Konfluenz für 48 Stunden induziert. Nach Abschluss der Induktion wurden die Zellen zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend wurden 2 ml Triton/Glycerol Lysepuffer in die Flaschen gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst. Der Lyseschritt erfolgte für eine Stunde bei 4°C auf einem rotierenden Schüttler. In einem nächsten Schritt wurde das Lysat bei 13000 g und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Zu 1 ml des Überstandes wurden 25 μl der FLAG-Antikörper-*beads* gegeben und es folgte erneut ein einstündiger Inkubationsschritt bei 4°C auf einem rotierenden Schüttler. Anschließend wurden die Proben für 10 Sekunden bei 13000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einem fünfmaligen Waschschritt mit Triton/Glycerol Lysepuffer wurde das verbleibende FLAG-*beads*/Protein-Pellet in 40 μl Glycin (0,1 M pH 3) resuspendiert und dadurch die zuvor präzipitierten Proteine in Lösung gebracht. Ein anschließender Zentrifugationsschritt für 10 Sekunden bei 13000 g pelletierte die FLAG-*beads*. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und dieser

Schritt wiederholt. Das finale Eluat (80 µl) wurde in einem letzten Schritt mit 8 µl einer 1 M Tris-Lösung (pH 8) neutralisiert und für durchzuführende Western-Blots mit 4 x Probenpuffer versetzt. Die Auftrennung der Präzipitate erfolgte mit Hilfe der Tricin-SDS-PAGE (siehe 2.2.2.3).

2.2.4.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Identifizierung der Lokalisation von Proteinen in Zellen oder Geweben ist die Methode der indirekten Immunfluoreszenzfärbung geeignet, bei der das zu untersuchende Protein mit Hilfe eines primären Antikörpers detektiert wird, welcher spezifisch an ein oder mehrere Epitope dieses Proteins bindet. In der vorliegenden Arbeit wurden unmarkierte primäre Antikörper in Kombination mit sekundären Antikörpern eingesetzt, die mit Alexa Fluor® Farbstoffen konjugiert sind. Für die Auswertung wurden die Präparate mit einem Fluoreszenzmikroskop der Firma Carl Zeiss MicroImaging GmbH untersucht.

Für indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen wurden adhärent wachsende Zellen auf Transwell® Filtern (alternativ auf Deckgläschen) ausgesät und nach Abschluss des jeweiligen Experimentes für die weiteren Schritte verwendet. Dabei wurde zuerst das Medium der apikalen und basalen Kammer (siehe Abbildung 2-3) abgesaugt. Anschließend wurde die apikale Kammer mit 2 ml der PFA-Arbeitslösung geflutet und die Filter für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Abschluss dieses Schrittes wurde die PFA-Arbeitslösung abgesaugt und die Filter mit 1 ml PBS gewaschen. Drei folgende 5-minütige Waschschrte mit Quenching Puffer dienten der Hemmung der PFA-Autofluoreszenz und somit der Verringerung von Hintergrundsignalen bei der Auswertung. Ein daran anschließender 30-minütiger Inkubationsschritt mit Blockier- und Verdünnungspuffer sättigte unspezifische Antikörperbindungsstellen ab. In diesem Puffer wurden auch alle verwendeten Antikörper verdünnt und nach Abschluss des Blockiervorganges erfolgte eine Inkubation der Filter für 3 h bei RT mit dem jeweiligen primären Antikörper. Nach einem Waschschrte (6 x 5 min Waschpuffer) auf einem Schüttler wurden die entsprechenden sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht auf die Filter gegeben. Es folgte ein erneuter Waschschrte (6 x 5 min).

Für die Auswertung der untersuchten Filter am Mikroskop musste die Membran eines Filters mit einem Skalpell herausgeschnitten und anschließend auf einen Objektträger gebracht werden. Das bei diesem Vorgang verwendete ProLong® Antifade Kit der Firma Life Technologies GmbH sollte eine möglichst lange Fluoreszenz gewährleisten. Die Ränder der

dabei eingesetzten Deckgläschen wurden im finalen Schritt mit Nagellack fixiert, was eine längerfristige Lagerung im Dunkeln bei 4 °C möglich machte.

2.2.5 Elektrophysiologische Methoden

2.2.5.1 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEW) mit Hilfe eines Volt-Ohm Meters stellt die sensitivste Methode zur Erfassung der Barrierefunktion dar, denn mit ihr kann der passive Ionenfluss über eine Epithelschicht erfasst werden. Es existieren dabei die transzelluläre und die parazelluläre Route, wobei jedoch aufgrund des hohen Widerstandes epithelialer Membranen die Messung des TEW größtenteils (75 – 94 %) den parazellulären Widerstand widerspiegelt (Bliklager *et al.*, 2007). Bei einer beeinträchtigten Barrierefunktion ist demzufolge die parazelluläre Permeabilität gegenüber Ionen erhöht und damit der transepitheliale elektrische Widerstand vermindert (siehe Abbildung 2-3).

Für alle Widerstandsmessungen wurden Zellen auf permeablen Transwell® Filtern der Firma Corning ausgesät (siehe Abbildung 2-3). Diese stellen ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung von epithelialen Darmzellen dar, denn sie ermöglichen es Zellen unter *in vivo*-ähnlichen Zellkulturbedingungen zu untersuchen. Die Filter bestehen aus einer durchlässigen Membran auf der die Polarisation, d.h. die Ausbildung einer apikalen und einer basolateralen Seite, von geeigneten Zellen stattfinden kann (Meunier *et al.*, 1995).

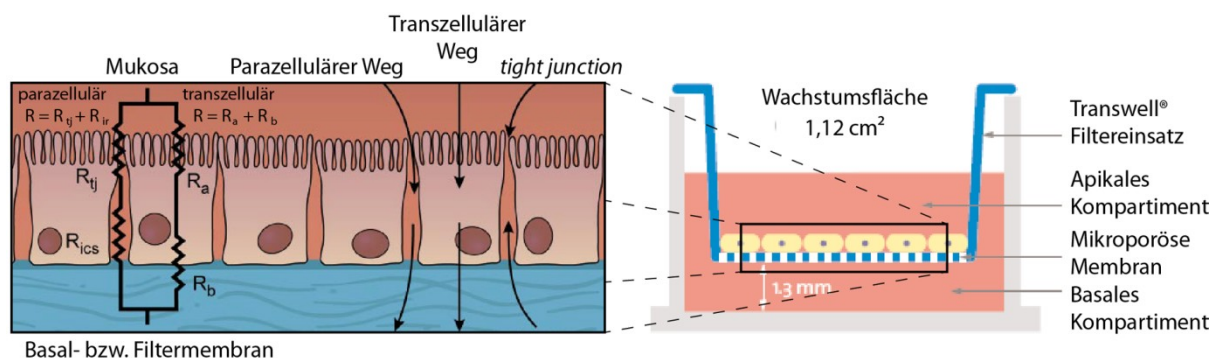


Abbildung 2-3 | Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes von Enterozyten
Schematische Darstellung der Komponenten in Enterozyten, welche zum transepithelialen elektrischen Widerstand beitragen und der verwendeten Transwell® Filter. R_{ij} – Widerstand der *tight junction*; R_{ir} – Widerstand des interzellulären Raumes; R_a – Widerstand der apikalen Membran; R_b – Widerstand der basolateralen Membran. Modifiziert nach (Bliklager *et al.*, 2007) und Corning Transwell® Zellkultursysteme Handbuch.

Vor Beginn der Messungen wurde die Elektrode in 70 %-tigem Ethanol für 20 Minuten desinfiziert und anschließend für 10 Minuten in D-MEM Medium äquilibriert. Die Messung

der Widerstände wurde daran anschließend direkt nach Entnahme der Filter aus dem Brutschrank durchgeführt. Bei allen Messungen wurde der Widerstand eines Leerfilters gemessen und vom ermittelten Widerstand der mit Zellen besetzten Filter abgezogen. Um etwaige Schwankungen durch verschieden große Filter auszugleichen, wurde der TEW in $\text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$ angegeben. Nach Beendigung der Messungen wurde die Messelektrode in D-MEM Medium bis zum nächsten Messpunkt aufbewahrt.

2.2.5.2 Messung von biionischen Potentialen

Mit Hilfe dieser Methode kann man die parazelluläre Permeabilität von verschiedenen großen Kationen bestimmen. Für die Bestimmung ist initial die Messung des Na^+/Cl^- Verdünnungspotenzials notwendig. Die dafür erforderliche Messung findet in zwei voneinander getrennten Kompartimenten (apikaler und basaler Bereich eines Transwell® Filters) statt, bei denen die Ionen eines Kompartimentes durch Mannitol ersetzt werden, wodurch der osmotische Ausgleich gewährleistet ist. In der Folge entsteht ein Diffusionspotential, welches über die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung errechnet werden kann. Durch Umstellung der Gleichung erhält man die relative Permeabilität von Na^+ gegenüber Cl^- ($P_{\text{Na}}/P_{\text{Cl}}$). Im nächsten Schritt kann durch Substitution der basolateralen NaCl -Lösung durch *KationCl*-Lösungen das biionische Potential für verschieden große Kationen bestimmt werden. Eine ausführliche Beschreibung der Theorie und der verwendeten Gleichungen ist bei Yu *et al.* zu finden (Yu *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde als Basislösung *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) verwendet (Tabelle 2.6). Die erforderliche pH-Anpassung (pH 7,4) wurde mit KOH durchgeführt, um einen zusätzlichen Na^+ -Einstrom zu minimieren.

Tabelle 2-6 | HBSS Basislösung

Substanz	mM	Molekulargewicht [g/mol]	Menge für 1,6 l [g]
Na_2HPO_4	0,3	141,96	0,0852
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4	246,5	0,1972
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,5	203,3	0,2033
KH_2PO_4	0,3	136,1	0,0817
CaCl_2	1,3	147	0,3822
HEPES	15	238,31	7,1493
KOH	5	56,11	0,5611

Für den Kationenaustausch zur Bestimmung der biionischen Potentiale wurden folgende Lösungen verwendet (jeweils 250 ml HBSS + 138 mM Substanzkonzentration):

- i. Natriumchlorid ($\text{Na}\cdot\text{Cl}$; 1,9 Å)
- ii. Methylaminchlorid ($\text{MA}\cdot\text{Cl}$; 3,78 Å)
- iii. Ethylaminchlorid ($\text{EA}\cdot\text{Cl}$; 4,58 Å)
- iv. Tetramethylammoniumchlorid ($\text{TMA}\cdot\text{Cl}$; 5,5 Å)
- v. Tetraethylammoniumchlorid ($\text{TEA}\cdot\text{Cl}$; 6,58 Å)
- vi. N-methyl-D-Glucaminchlorid ($\text{NMDG}\cdot\text{Cl}$; 7,29 Å)

Die Berechnung der Permeabilitäten erfolgte mit einem von Dr. Chris Weber, University of Chicago, Chicago geschriebenen Excel-Makro.

2.2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde die GraphPad Prism Software (GraphPad Software, San Diego Kalifornien, USA) und Microsoft Excel (Microsoft Deutschland GmbH, D) eingesetzt. Mit Hilfe des F-Tests wurde geprüft, ob sich die Stichproben hinsichtlich ihrer Varianz unterscheiden und der folgende Student t-Test entsprechend angepasst. In allen Analysen wurde ein p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der TNF-induzierten Barrierestörung

Zur Validierung der bereits in der Einleitung erwähnten, aus Publikationen bekannten, zellulären Effekte einer kombinierten Gabe der Zytokine Interferon- γ (IFN) und Tumornekrosefaktor α (TNF), wurden Caco-2 Zellen verwendet. Diese humane Enterozytenzelllinie stellt ein geeignetes *in vitro* Modell zur Untersuchung von Vorgängen im intestinalen Kontext dar, denn sie weist viele Merkmale der intestinalen Mukosa auf. Zu diesen Merkmalen zählen unter anderem die Ausbildung eines apikalen Bürstensaums, unterhalb dessen die Epithelzellen über *tight junctions* miteinander verbunden sind, sowie die Expression von Nährstofftransportern und Hydrolasen nach einer 14 – 21-tägigen Differenzierungsphase (Meunier *et al.*, 1995). Zusätzlich dienten die Validierungsexperimente der Definition von experimentellen Bedingungen nachfolgender Untersuchungen.

Hierfür wurden Zellen auf permeablen Transwell® Filtern der Firma Corning ausgesät. Diese stellen ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchung von epithelialen Darmzellen dar, denn sie ermöglichen die Analyse von Zellen unter *in vivo*-ähnlichen Zellkulturbedingungen. Die Filter bestehen aus einer durchlässigen Membran, auf der die Polarisation, d.h. die Ausbildung einer apikalen und einer basolateralen Seite, erfolgen kann (Meunier *et al.*, 1995). Mit Hilfe eines Volt-Ohm Meters kann der elektrische Widerstand der Zellschicht (transepithelialer elektrischer Widerstand - TEW), der ein Maß für die Barrierefunktion darstellt (Blikslager *et al.*, 2007), in $\text{Ohm} \cdot \text{cm}^2$ bestimmt werden. Bei einer beeinträchtigten Barrierefunktion ist die parazelluläre Permeabilität gegenüber Ionen erhöht und damit der transepitheliale elektrische Widerstand vermindert.

Nach Abschluss der Differenzierungsphase wurden die Zellen für 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) vor- und anschließend für sechs Stunden mit IFN (10 ng/ml) und TNF (5 ng/ml) in Kombination behandelt. Eine 24-stündige IFN-Vorbehandlung ist für die TNF-induzierte epitheliale Barrieredysfunktion obligatorisch, da diese eine Hochregulation der TNF-Rezeptoren ermöglicht (Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde mit dem auch therapeutisch eingesetzten Adalimumab ein spezifisch gegen TNF gerichteter Antikörper verwendet, um die TNF-Spezifität der beobachteten Effekte zu untersuchen. Übereinstimmend mit bereits publizierten Arbeiten (Bruewer *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006) konnte in den IFN/TNF-behandelten Zellen bereits nach sechs Stunden ein signifikanter Abfall des TEW (auf $82,3 \pm 10,9$ % im Vergleich zu

Kontrollzellen, $p < 0,05$) gemessen werden (Abbildung 3-1A). Daran anschließende indirekte Immunfluoreszenzanalysen für die Proteine ZO-1 und Occludin, zwei wesentliche Komponenten des *tight junction* Komplexes, welche mit zuvor gemessenen Filtern durchgeführt wurden, zeigten wellenförmige Modulationen der *tight junction* Areale in IFN/TNF-behandelten Zellen (Abbildung 3-1B, weiße Pfeile). Darüber hinaus fand sich in Übereinstimmung mit zuvor publizierten Arbeiten (Marchiando *et al.*, 2010) eine Internalisierung des integralen *tight junction* Transmembranproteins Occludin (Abbildung 3-1B, gelber Pfeil). Eine Erhöhung der verwendeten Zytokindosen (20 ng/ml IFN und 20 ng/ml TNF) und eine gleichzeitige Verlängerung der Behandlungsdauer auf 24 Stunden resultierte in einer weiteren Verstärkung der Barrieredysfunktion, welche durch eine hochsignifikante Abnahme des TEW auf $29 \pm 4,7 \%$, $p < 0,001$ von Kontrollzellen und schwerwiegende Störungen der Monolayer-Architektur charakterisiert war (Abbildung 3-1C/D, weiße Pfeile). Zusätzlich zeigte sich unter diesen Bedingungen eine bereits in der Immunfluoreszenzmikroskopie deutlich nachweisbare Reduktion der Zellzahl, die darauf hinweist, dass bei Verwendung dieser experimentellen Bedingungen neben den spezifischen Auswirkungen auf die *tight junctions* auch zytotoxische Effekte auftreten. Aufgrund dieser Beobachtungen, die im Einklang mit zuvor publizierten Daten stehen (Gitter *et al.*, 2000; Zeissig *et al.*, 2004), wurden für die weiteren Experimente die zuvor benutzten niedrigeren Zytokinkonzentrationen (IFN 10 ng/ml, TNF 5 ng/ml) verwendet, um eine möglichst große Spezifität des Barriedefektes ohne wesentliche Einflüsse von zytotoxischen Effekten zu gewährleisten.

In allen durchgeführten Experimenten konnte die TNF-Spezifität der beobachteten Ergebnisse mit Hilfe von Adalimumab nachgewiesen werden, denn die Gabe dieses TNF-Antikörpers antagonisierte die IFN/TNF-induzierten Veränderungen (Abbildung 3-1).

Darüber hinaus zeigte sich übereinstimmend mit bereits publizierten Daten, dass die Zytokinbehandlung unter den gewählten Bedingungen zu einer erhöhten Phosphorylierung der Myosin Leichtkette führte, welche in zahlreichen Vorarbeiten als entscheidende Determinante der TNF-induzierten Barrieredysfunktion identifiziert werden konnte (Blair *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006; Turner *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2005; Yuhan *et al.*, 1997) (Abbildung 3-1E). Übereinstimmend mit der postulierten Schlüsselrolle von TNF bei diesen Prozessen führte die zusätzliche Gabe von Adalimumab zu einer Antagonisierung der beobachteten Effekte.

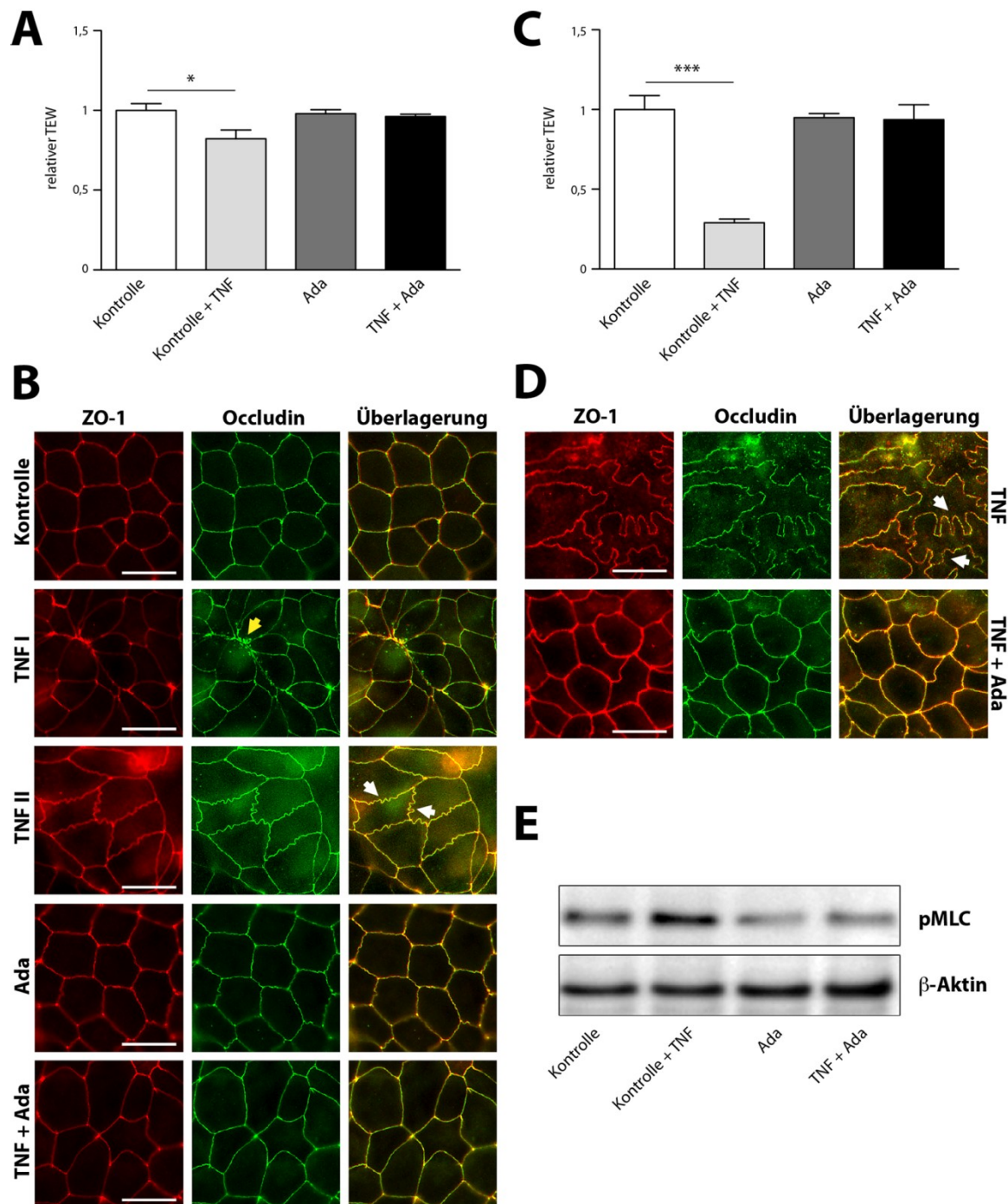


Abbildung 3-1 | Validierung der TNF-induzierten Barrierestörung Humane Caco-2 Zellen wurden für 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) vorbehandelt und anschließend für weitere 6 oder 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml oder 20 ng/ml) und TNF (5 ng/ml oder 20 ng/ml) kultiviert. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung mit dem humanen anti-TNF-Antikörper Adalimumab. A/C) Balkendiagramm der gemessenen transepithelialen elektrischen Widerständen nach IFN/TNF-Behandlung (A: 6 h Behandlung, 10 ng/ml IFN + 5 ng/ml TNF; C: 24 h Behandlung, 20 ng/ml IFN + 20 ng/ml TNF). (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$; $n = 4$; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar) B/D) Indirekte Immunfluoreszenz für die *tight junction* Komponenten ZO-1 und Occludin für Kontroll- und IFN/TNF-behandelte Zellen. Die weißen Pfeile weisen auf Störungen der *tight junction* Architektur hin, der gelbe Pfeil signalisiert die Internalisierung von Occludin. TNF I und TNF II kennzeichnen unterschiedliche Ausschnitte desselben Präparates (B: 6 h Behandlung, 10 ng/ml IFN + 5 ng/ml TNF; D: 24 h Behandlung, 20 ng/ml IFN + 20 ng/ml TNF). (Weißer Maßstab: 20 μm) E) MLC-Phosphorylierungsniveau nach sechsstündiger IFN/TNF-Gabe (10 ng/ml IFN + 5 ng/ml TNF). Als Ladekontrolle diente das ubiquitär exprimierte β -Aktin.

Zusammenfassend konnten in diesem Abschnitt die experimentellen Bedingungen etabliert werden, unter denen die Behandlung von Caco-2 Zellen mit den Zytokinen IFN und TNF zu einer reproduzierbaren Störung der Barrierefunktion mit begleitenden Veränderung in der Morphologie der *tight junctions* sowie einer Erhöhung des MLC-Phosphorylierungsniveaus führten und so die Voraussetzungen für die nachfolgenden funktionellen Untersuchungen geschaffen werden.

3.2 Effekte der RhoA-Aktivierung auf die epitheliale Barriere

3.2.1 Generierung eines induzierbaren Expressionssystems für konstitutiv aktives RhoA

Wie einleitend beschrieben lieferten mehrere Publikationen Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der kleinen GTPase RhoA an der Regulation der *tight junction* Permeabilität, welche über eine Modulation der MLC-Aktivierung vermittelt wird (Amano *et al.*, 1996; Chaturvedi *et al.*, 2011; Kimura *et al.*, 1996; Schwartz, 2004). Um zu untersuchen, ob eine RhoA-Aktivierung auch im intestinalen Epithel einen vergleichbaren Effekt hat, wurde die RhoA Punktmutante RhoAG14V in Caco-2 zellen exprimiert. Der Aminosäureaustausch von Glycin mit Valin führt hierbei zu einer konstitutiven Aktivierung von RhoA (Garrett *et al.*, 1989), die unabhängig von übergeordneten GEFs ist und damit die Untersuchung der RhoA-Aktivierung unabhängig von den aktivierenden Signalwegen ermöglicht. Für diese Untersuchungen wurde ein induzierbares Expressionssystem etabliert, da es gegenüber der konstitutionellen Expression wichtige Vorteile aufweist. So könnte die Expression von konstitutiv aktivem RhoA mit der notwendigen Differenzierungsphase (Meunier *et al.*, 1995) interferieren und damit die Interpretation der Ergebnisse beeinflussen. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Tatsache, dass die Caco-2 Zelllinie nicht homogen ist, sondern Eigenschaften einer polyklonalen Zellpopulation aufweist (Sambuy *et al.*, 2005; Volpe, 2008; Yu *et al.*, 1997). Der Einsatz eines induzierbaren Systems ermöglicht demzufolge die Effekte einer Aktivierung in derselben Zellpopulation zu untersuchen.

Für die im Rahmen der Doktorarbeit durchgeführten Untersuchungen zur Rolle von RhoA bei der Regulation der epithelialen Barriere nach TNF-Behandlung wurde die konstitutiv aktive (KA) Variante von RhoA in den induzierbaren, mit einem bidirektionalen Promotor ausgestatteten pBI-L Vektor der Firma Clontech subkloniert. Der Vorteil dieses Vektors liegt in seiner Eigenschaft begründet, neben dem gewünschten Zielgen gleichzeitig ein Luziferase-Gen zu exprimieren, sobald Tetrazyklin/Doxyzyklin (in der vorliegenden Arbeit wurde

ausschließlich Doxzyklin verwendet) aus dem Kulturmedium entfernt wird (Tet-Off Genexpressionssystem). Zur schnellen und kostengünstigen Identifikation von geeigneten Zellklonen ist die Messung der Luziferase-Expression in einem Luminometer vorteilhaft, da die notwendigen Schritte für eine Detektion im Western-Blot bzw. im RT-PCR System entfallen.

Die RhoA-Mutante (RhoAG14V – KA) wurde mit Hilfe eines HindIII/XhoI Verdaus aus ihrem pcDNA3.1 Vektor in den zuvor mit HindIII/SalI geschnittenen pBI-L Vektor eingebracht. Kompetente DH5α *E.coli* Bakterien dienten dabei als Rezipientenstamm für das RhoAG14V-pBI-L-Konstrukt, dessen Nukleotidsequenz nach Abschluss der Klonierungsarbeiten durch Sequenzierungsanalysen auf Korrektheit überprüft wurde. Eine graphische Übersicht des generierten RhoAG14V-pBI-L-Konstrukte ist in Abbildung 3-2 dargestellt.

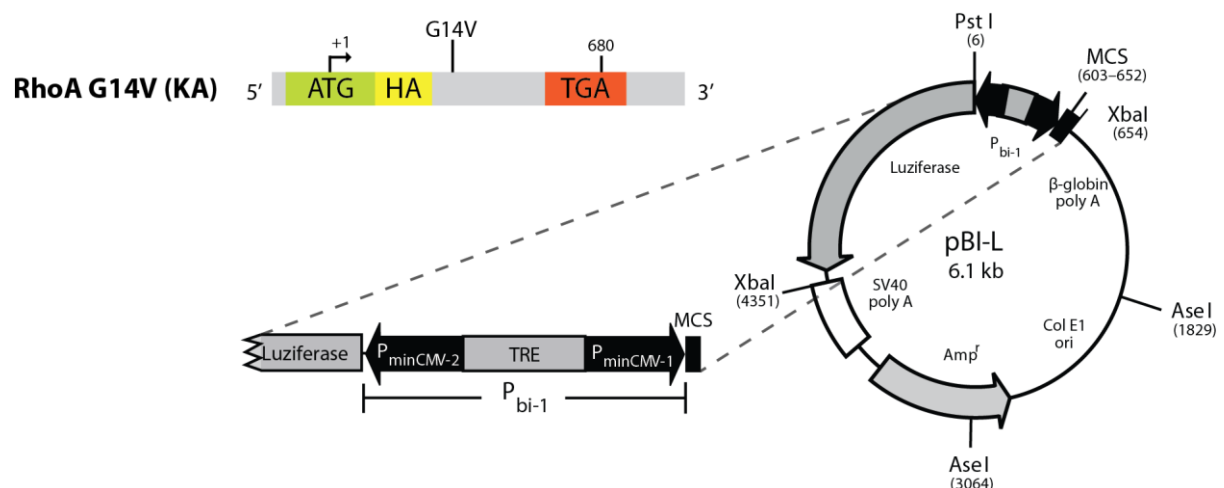


Abbildung 3-2 | Das im Rahmen der Doktorarbeit verwendete RhoAG14V-pBI-L-Konstrukt
Dargestellt ist das RhoA-Konstrukt, welches in den pBI-L Vektor der Firma Clontech subkloniert wurde. Start- und Stopcodon, sowie das HA-Epitop sind farblich markiert und an ihrer korrekten Position eingezeichnet. Die Zahlen über dem Konstrukt kennzeichnen die Länge in Basenpaaren. Zusätzlich sind die ausgetauschten Aminosäuren dargestellt. KA: konstitutiv aktiv.

Nach Abschluss der Klonierungsarbeiten wurden humane Caco-2 Zellen aufgrund ihrer bereits erwähnten Eigenschaften als Modellsystem ausgewählt. Die für die Etablierung eines induzierbaren Expressionssystems notwendigen Zellen waren bereits erfolgreich mit dem Regulatorprotein tTA (Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator) transfiziert und wurden von unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Jerrold R. Turner (University of Chicago, USA), der sie bereits für Publikationen (Shen *et al.*, 2006) benutzt hatte, zur Verfügung gestellt (Klon 4C4).

In Abwesenheit von Doxyzyklin bindet tTA an den Tetrazyklin-regulierbaren Promotor, welcher Bestandteil des pBI-L-Vektors ist, und aktiviert somit die bidirektionale Transkription der Luziferase und des RhoA-Konstrukts. Das pBI-L-Konstrukt wurde zusätzlich mit einem linearisierten Selektionsmarker (pTK-Puromycin) kotransfiziert, welcher eine effiziente Selektion der erfolgreich transfizierten Zellklone gewährleistete (1 µg/ml Puromycin im Zellkulturmedium). Nach der Puromycin-Selektion wurden mit Hilfe von Klonierungszyklindern Einzelzellklone gewonnen und diese auf ihre Expressionseigenschaften hin analysiert.

3.2.2 Etablierung eines induzierbaren Expressionssystems für konstitutiv aktives RhoA

Für die anschließenden Expressionsanalysen der konstitutiv aktiven RhoA-Mutante wurden 20 Klone nach einer initialen Wachstumsphase in passivem Lysepuffer lysiert und die Luziferase-Expression mit einem Luminometer bestimmt. Nur Zellklone mit einer niedrigen basalen Luziferase-Expression (Medium mit Doxyzyklin) und einer hohen Expression nach Doxyzyklin-Entzug wurden für weiterführende Experimente berücksichtigt. In Abbildung 3-3 ist exemplarisch der für alle weiterführenden Analysen während dieser Doktorarbeit verwendete Zellklon dargestellt.

Abbildung 3-3A zeigt die Luziferase-Expression des RhoAG14V-Zellklons, welcher für 48 Stunden mit und ohne Doxyzyklin im Medium kultiviert wurden. Der ausgewählte Klon wies eine niedrige basale sowie eine hohe Expression nach Induktion auf (KA RhoA: + dox = 37424 ± 1030 RLU, - dox = 8929433 ± 31553 RLU, Induktionsfaktor ~ 238). Zusätzlich wurde in diesem Zellklon die Expression des Zielgens auf Proteinebene per Western-Blot (WB) nachgewiesen (Abbildung 3-3B).

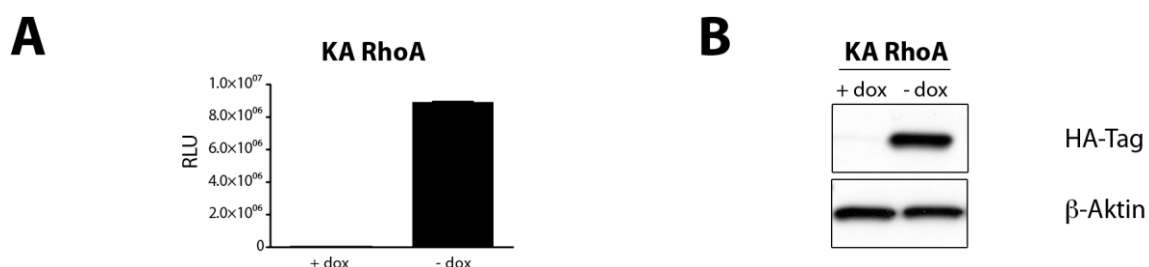


Abbildung 3-3 | Expressionsvalidierung und -analyse des im Rahmen der Doktorarbeit etablierten RhoA-pBI-L-Konstruktes A) Luziferase-Expression in Zellklonen nach 48-stündiger Kultivierung in Medium mit (100 ng/ml) und ohne Doxyzyklinzusatz. (Duplikatmessung; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar) B) Expressionsniveau auf Proteinebene nach 48-stündiger Inkubation in Medium mit (100 ng/ml) und ohne Doxyzyklin. Als Ladekontrolle diente β-Aktin.

Unter den betrachteten Bedingungen konnte in dem RhoAG14V exprimierenden Klon eine deutliche Proteinexpression (HA-Tag) nach Induktion bei minimaler basaler Expression in nicht induzierten Zellen beobachtet werden. Alle Expressionsanalysen wurden unter unabhängigen Bedingungen reproduziert.

3.2.3 Charakterisierung des Induktionsverhaltens des konstitutiv aktiven RhoA Zellklons

Im Rahmen der Grundcharakterisierung des Expressions- bzw. Induktionsverhalten des zuvor generierten Zellklons wurden weitere Analysen durchgeführt.

Da induzierbare Tet-Off und Tet-On Systeme sehr empfindlich auf kleinste Mengen Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin reagieren, wurden in einem ersten Schritt verschiedene Chargen von fötalem Rinderserum (FBS) auf ihre Verwendbarkeit für die weiteren Experimente hin untersucht, denn die Anwesenheit geringster Mengen an Tetrazyklinen im Serum kann zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Induktionseigenschaften führen. Abbildung 3-4A zeigt beispielhaft den Vergleich von zwei unterschiedlichen Chargen, die mittels Luziferase-Assay und Western-Blot auf ihre Auswirkungen auf die Induktionsfähigkeit des Zielproteins hin untersucht wurden.

Die Charge B wies bei diesen Analysen eine höhere Maximaexpression bei gleichbleibend niedriger Basalexpression sowohl im Luziferase-Assay als auch im Western-Blot auf. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde diese Charge für alle weiteren Experimente verwendet. Daran anschließend erfolgte eine Untersuchung des Induktionsniveaus in Abhängigkeit von der Doxyzyklinkonzentration. Hierfür wurden subkonfluente Zellen 48 Stunden mit verschiedenen Doxyzyklinkonzentrationen kultiviert. Wie in Abbildung 3-4B dargestellt, ließ sich bereits bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml Doxyzyklin im Zellkulturmedium eine deutliche Verringerung der Zielgenexpression detektieren. Ab 1 ng/ml Doxyzyklin war die Genexpression nahezu vollständig reprimiert bzw. unter dem Detektionslimit des Western-Blot Systems. Aufgrund der geringen Toxizität der benutzten Dosen (LD_{50} für männliche Mäuse beträgt etwa 1007 mg/kg (Riond und Riviere, 1988)) wurde für alle folgenden Versuche eine Doxyzyklinkonzentration im Zellkulturmedium von 100 ng/ml gewählt.

Die Halbwertszeit von Doxyzyklin liegt bei 24 Stunden (Clontech Laboratories, 2005), was einen Mediumswechsel alle drei Tage erlauben sollte. Um dies zu verifizieren, wurden Zellen nach 48 und nach 72 Stunden ohne Mediumswechsel geerntet und mittels Western-Blot auf

ihre RhoA-HA Expression hin untersucht. Abbildung 3-4C verdeutlicht, dass die Repression der Zielgenexpression auch nach drei Tagen ohne Mediumswechsel gewährleistet war.

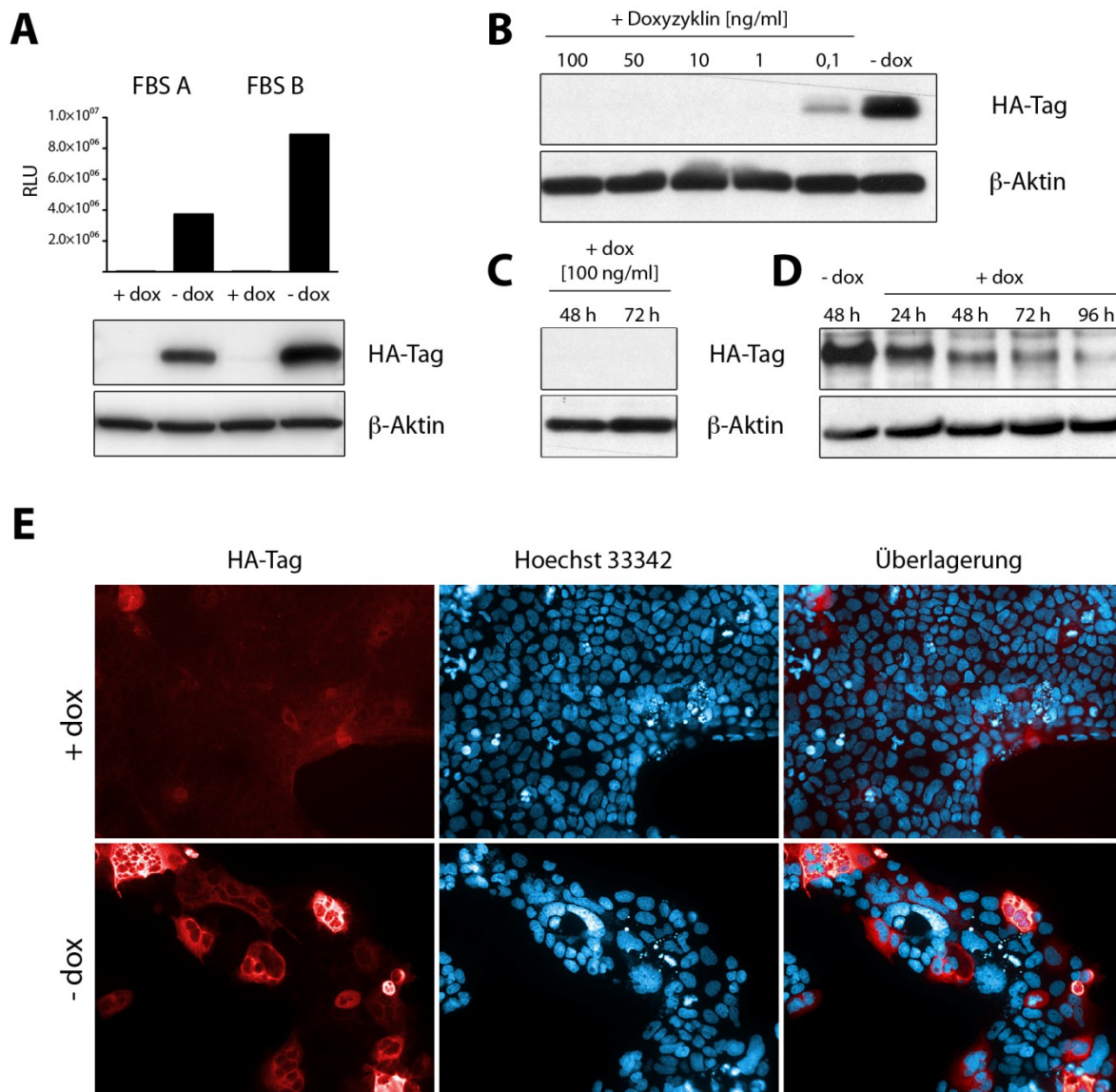


Abbildung 3-4 | Grundcharakterisierung des Induktionsverhaltens des KA RhoA Zellklons A) Dargestellt ist die Luciferase-Expression und der korrespondierende HA-Tag Western-Blot (β-Aktin diene als Ladekontrolle) von zwei unterschiedlichen FBS-Chargen vor und nach Induktion. B) HA-Tag Western-Blot (Ladekontrolle β-Aktin) zur Untersuchung der doozyklinindosisabhängigen Repression der KA RhoA-Expression (subkonfluente Zellen wurden für 48 Stunden mit unterschiedlichen Doozyzyklindosiskonzentrationen kultiviert). C) KA RhoA-Expression (HA-Tag WB; Ladekontrolle β-Aktin) nach dreitägiger Inkubation (+ dox) ohne Mediumswechsel. D) Repression der KA RhoA-Expression nach vorheriger Induktion (HA-Tag WB; Ladekontrolle β-Aktin). E) Indirekte Immunfluoreszenz für KA RhoA (HA-Tag) vor (+ dox) und nach (- dox) Induktion (Zellkerne mit Hoechst 33342 angefärbt; 200-fache Vergrößerung).

Weitere Expressionsstudien sollten klären, ob die Zugabe von Doxyzyklin zu einer Repression der Expression in zuvor induzierten konfluenten Zellmonolayern führt. Abbildung

3-4D zeigt, dass im beobachteten KA RhoA Zellklon nach 96 Stunden die Expression von exogenem RhoA nahezu vollständig reprimiert war.

In einem letzten Schritt wurden indirekte Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt, in denen die Expression von konstitutiv aktivem RhoA in subkonfluenten Zellen nach Induktion durch Detektion des HA-Tags auf Einzelzellebene untersucht wurde. Hierbei zeigte sich übereinstimmend mit den Luziferase- bzw. Western-Blot Analysen eine deutliche Zunahme RhoAG14V-positiver Zellen mit überwiegend zytoplasmatischer Lokalisation des Zielproteins bei einer geringen Basalexpression im nicht induzierten Zustand (Abbildung 3-4E). Bemerkenswerterweise zeigten diese Analysen jedoch auch, dass nicht alle Zellen innerhalb der induzierten Population das Zielprotein zum Analysezeitpunkt exprimierten, was darauf hindeutet, dass auch der selektierte Klon ähnlich wie die Ausgangszelllinie ein nicht vollständig homogenes Verhalten aufweist.

3.2.4 Validierung der Funktionalität der untersuchten RhoA-Mutante

Nachdem die Induktion bzw. Repression der Genexpression im untersuchten Klon sichergestellt war, wurde die Funktionalität der exprimierten RhoA-Mutante mit Hilfe eines RhoA Aktivierungsassays der Firma Cytoskeleton untersucht. Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung von aktivem RhoA, welches eine immobilisierte Rho-Bindungsdomäne bindet und in späteren Schritten durch die Verwendung eines spezifischen Antikörpers detektiert werden kann. Zusätzlich zum pBI-L-RhoA-Klon wurden die nicht RhoA-transfizierten Parentalzellen (der tTA exprimierende Klon 4C4) als Kontrollgruppe untersucht. Alle untersuchten Gruppen wurden für 24 Stunden in 0,5 % FBS-haltigem Hungermedium mit Doxyzyklin (100 ng/ml) kultiviert und anschließend erfolgte eine 48-stündige Induktionsphase bei der dem Hungermedium das Doxyzyklin entzogen wurde.

Zellen, welche die konstitutiv aktive RhoA-Mutante exprimierten (KA RhoA – dox), wiesen eine mit der Positivkontrolle vergleichbare RhoA-Aktivierung ($5,63 \pm 0,47$ -fach, Positivkontrolle 7,96-fach im Vergleich zur Kontrolle) sowohl im Vergleich zu Kontrollzellen als auch zu Zellen, in denen die konstitutiv aktive RhoA-Expression ausgeschaltet war (KA RhoA + dox), auf (Abbildung 3-5).

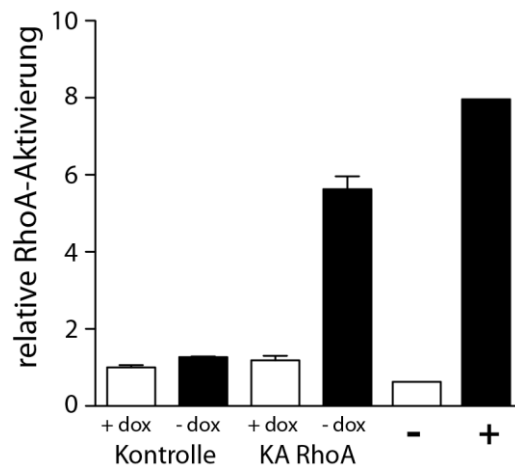


Abbildung 3-5 | Validierung der Funktionalität der untersuchten RhoAG14V-Mutante Dargestellt ist die relative RhoA-Aktivierung nach 48-stündiger Induktion der Expression. Die untersuchten Zellen wurden für 24 Stunden in Hungermedium (0,5 % FBS) mit 100 ng/ml Doxyzyklin kultiviert und anschließend für 48 Stunden induziert. Als Negativkontrolle diente Wasser, als Positivkontrolle RhoA-GTP Protein aus dem G-Lisa™ small G-Protein Activation Assay Kit. (Duplikatmessungen; Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar)

3.2.5 Einfluss von Doxyzyklin bzw. der RhoA-Expression auf die Differenzierung der untersuchten Zellklone

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Expression der KA RhoA-Mutante ein höheres RhoA Aktivierungsniveau zur Folge hat, sollte anschließend der Einfluss von Doxyzyklin bzw. der Expression der RhoA-Mutante auf den Differenzierungsvorgang des Zellklons im Vergleich zu Kontrollzellen untersucht werden. Unter normalen Bedingungen kommt es im Zuge der etwa 14-21-tägigen Differenzierung von Caco-2 Zellen zu einer vermehrten Expression der membranständigen alkalischen Phosphatase (AP), welche als Differenzierungsmarker in Kolonkarzinomzellen gut etabliert ist (Matsumoto *et al.*, 1990; Sambuy *et al.*, 2005). Die vermehrte Expression und damit die relative Erhöhung der Aktivität der AP wurden mit Hilfe einer kolorimetrischen Untersuchung bestimmt.

Abbildung 3-6 zeigt, dass weder die Gabe von Doxyzyklin, noch die Induktion des Zielgens einen signifikanten Einfluss auf die AP-Aktivität der untersuchten Zellen hatte.

Nach etwa 14 Tagen war in beiden untersuchten Gruppen ein Plateau erreicht, welches die größtenteils abgeschlossene Differenzierung signalisiert. Die Bestimmung der AP-Aktivität lieferte somit keinen Hinweis auf einen möglicherweise die weiteren Experimente bzw. Ergebnisse beeinflussenden Effekt.

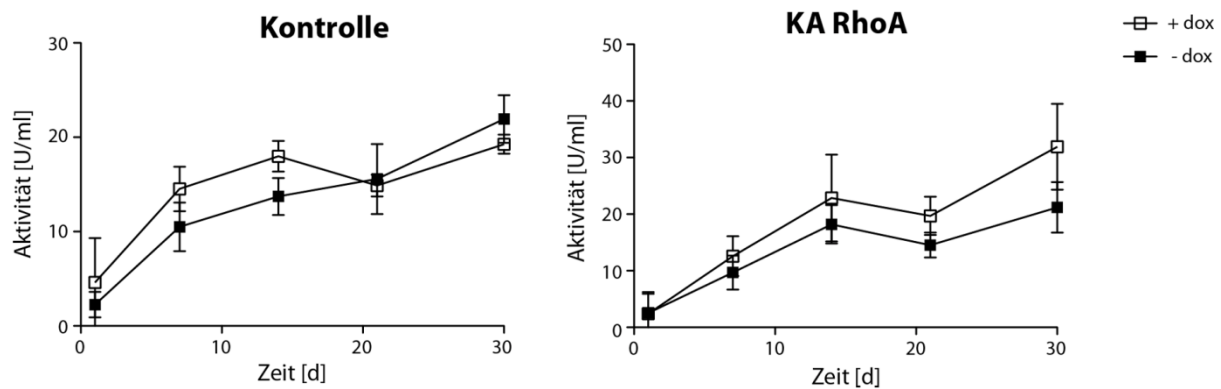


Abbildung 3-6 | Einfluss von Doxyzyklin bzw. der RhoA-Expression auf den intestinalen Differenzierungsmarker alkalische Phosphatase Die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde an fünf verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung (Tag 1, 7, 14, 21 und 30) mit Hilfe einer kolorimetrischen Untersuchung bestimmt. Hierfür wurden Zellen für den angezeigten Zeitraum jeweils mit oder ohne 100 ng/ml Doxyzyklin kultiviert und daran anschließend erfolgte die Bestimmung der AP-Aktivität gemäß des in Material und Methoden dargestellten Protokolls. (n=3; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar)

3.2.6 Transepitheliale elektrische Widerstände der konstitutiv aktiven RhoA-Mutante

Nachdem gewährleistet war, dass der zuvor generierte Klon induzierbar und funktional war sowie dass im Medium befindliches Doxyzyklin bzw. die Zielgenexpression keinen Einfluss auf die Differenzierung hat, sollten mit Hilfe des Transwell®-Systems mögliche Auswirkungen der RhoA-Mutanten-Expression auf die epitheliale Barriere untersucht werden. Hierfür wurden zunächst Zellen, die während der gesamten Differenzierungsphase ohne Doxyzyklin kultiviert wurden und daher die konstitutiv aktive RhoA Mutante exprimierten (- dox), mit Zellen verglichen, in denen die Zielgenexpression durch den Zusatz von Doxyzyklin reprimiert wurde (+ dox). Wie in Abbildung 3-7A dargestellt, fand sich unter diesen Bedingungen nach Abschluss der 21-tägigen Differenzierungsphase kein signifikanter Unterschied ($p = 0,07$) hinsichtlich des epithelialen Widerstandes zwischen diesen Gruppen. Abbildung 3-7B zeigt darüber hinaus, dass sich zwischen diesen beiden Gruppen auch im weiteren Zeitverlauf keine Unterschiede im TEW nachweisen ließen.

Im Gegensatz dazu fand sich in Zellen, in denen die RhoAG14V-Expression erst nach Abschluss der Differenzierung induziert wurde, indem nach 21 Tagen das Doxyzyklin aus dem Wachstumsmedium entfernt wurde (ab d21 – dox), ein signifikanter Abfall des TEW (auf $61,8 \pm 12,7 \%$, $p < 0,05$ im Vergleich zu Kontrollzellen (+ dox)) innerhalb von 96 Stunden nach Induktion (Abbildung 3-7B).

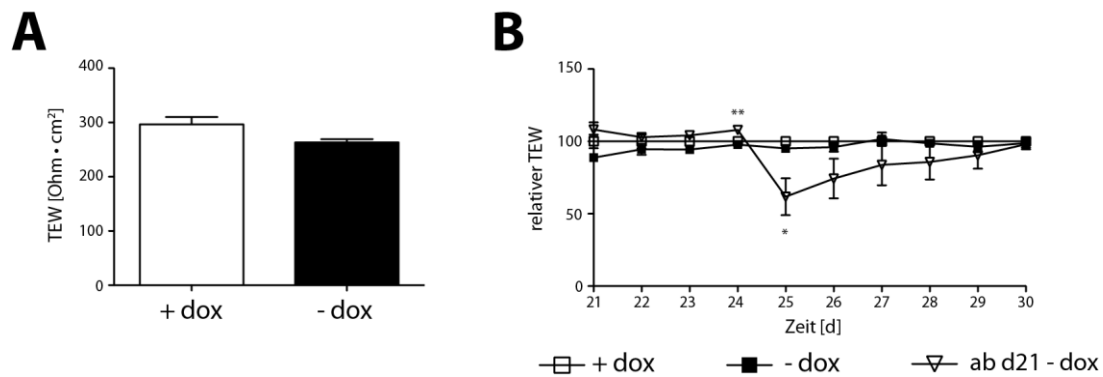


Abbildung 3-7 | Transepitheliale elektrische Widerstände der untersuchten konstitutiv aktiven RhoA-Mutante A) Transepithelialer elektrischer Widerstand nach Abschluss der 21-tägigen Differenzierungsphase. B) Relative Darstellung des TEW in Abhängigkeit der Zeit. Die Zellen wurden entweder mit 100 ng/ml Doxyzyklin (+ dox), ohne Doxyzyklin (- dox), oder erst nach 21 Tagen in Medium ohne Doxyzyklin kultiviert (ab d21 - dox). (*p < 0,05; **p < 0,01; n ≥ 3; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar)

Nach weiteren vier Tagen lag der gemessene Widerstand dann jedoch auch hier wieder im Bereich des Ausgangsniveaus. Somit konnte durch die Expression von konstitutiv aktivem RhoA eine transiente Störung der epithelialen Barriere im untersuchten Modellsystem induziert werden.

3.2.7 Aktivierte Signalwege nach KA RhoA-Induktion

Um analog zu den oben dargestellten Beobachtungen nach Stimulation mit IFN/TNF einen potenziellen Beitrag MLC-assoziiierter Signalwege für den beobachteten Abfall des TEW nach Induktion von konstitutiv aktivem RhoA zu untersuchen, wurde die Phosphorylierung der Myosin Leichtkette im Western-Blot untersucht. Darüber hinaus erfolgte ebenfalls eine Quantifizierung der MLCK-Expression auf Western-Blot Ebene, da dieses Enzym wie einleitend dargestellt von entscheidender Bedeutung für die Integrität der epithelialen Barriere ist. Die hierfür nötigen Proteinproben wurden an sechs Zeitpunkten parallel zu den TEW-Messungen (siehe Abbildung 3-7) isoliert. In den untersuchten Proben war eine deutliche Zunahme der KA RhoA-Expression im Verlauf der Zeit zu beobachten, welche ihr Maximum nach etwa 72-96 Stunden erreicht hatte (Abbildung 3-8A). Diese Zunahme der KA RhoA-Expression korreliert mit einer Zunahme der MLCK-Expression im untersuchten Zeitraum. Des Weiteren konnte eine vermehrte Phosphorylierung der Myosin Leichtkette mit fortschreitender Induktionsdauer detektiert werden. Eine gleichmäßige Beladung des Western-Blots konnte mit Hilfe der Ladekontrollen GAPDH und MLC sichergestellt werden.

Wie in Abbildung 3-8B/C ersichtlich ist, konnte in einem unabhängigen Immunfluoreszenzansatz sowohl eine erhöhte Anzahl an Stressfasern (Phalloidininfärbung des Aktin-Zytoskeletts) als auch ein erhöhter MLC-Phosphorylierungsgrad in KA RhoA exprimierenden Zellen nach Induktion gezeigt werden.

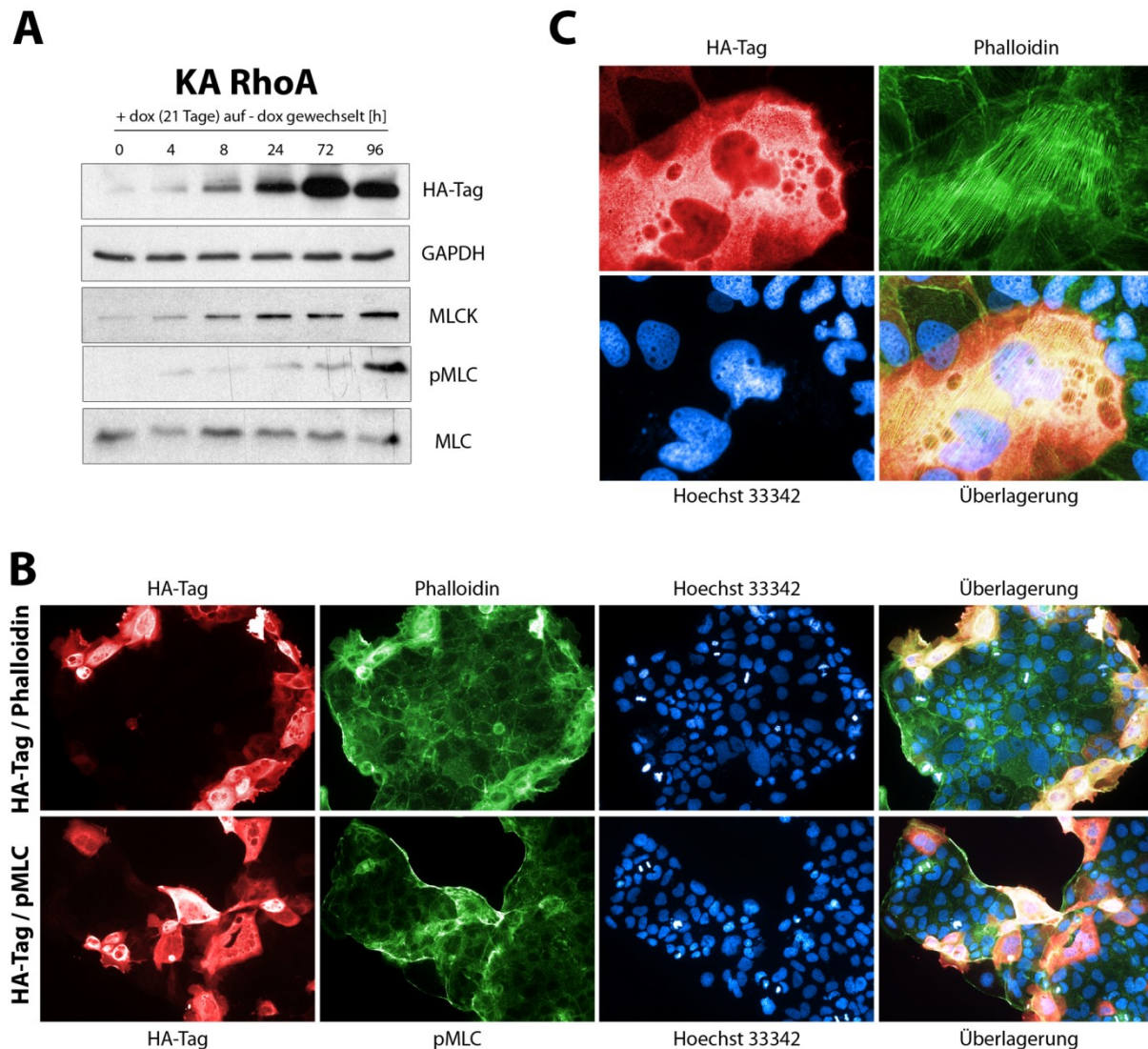


Abbildung 3-8 | Nach KA RhoA-Induktion aktivierte Signalwege A) Western-Blot Analyse ausgewählter, für die Barrierefunktion wichtiger Proteine. KA RhoA exprimierende Zellen wurden für 21 Tage mit Doxyzyklin (100 ng/ml) kultiviert, welches anschließend entfernt wurde. B) Indirekte Immunfluoreszenz nach 48-stündiger Induktion der KA RhoA-Expression (rot: HA-Tag; grün: Phalloidin bzw. phospho-MLC; blau: Zellkernfärbung mit Hoechst 33342 Farbstoff; 200-fache Vergrößerung). C) Formierung von Stressfasern nach Induktion von KA RhoA (630-fache Vergrößerung).

Übereinstimmend mit den oben beschriebenen Beobachtungen für die Induktion der konstitutiv aktiven RhoA Mutante auf Einzelzellebene (Abbildung 3-4E) zeigte sich auch in diesen Experimenten, dass nicht alle Zellen der induzierten Population die beschriebenen

Veränderungen aufwiesen. Es konnte jedoch demonstriert werden, dass alle Zellen, die nach Entfernung des Doxyzyklins aus dem Wachstumsmedium eine Expression der HA-markierten RhoAG14V-Mutante aufwiesen, auch mit einer erhöhten MLC-Phosphorylierung sowie der Ausbildung von Stressfasern reagierten, so dass diese Experimente eine kausale Beziehung zwischen der Aktivierung von RhoA und diesen Effekten unterstützen. Interessanterweise korreliert das in diesem Experiment höchste MLC-Phosphorylierungsniveau mit dem höchsten, signifikanten TEW-Abfall in den KA RhoA exprimierenden Zellen (vgl. Abbildung 3-8A mit 3-7B).

Zusammenfassend konnte ein TEW-Abfall mit paralleler MLC-Phosphorylierung in KA RhoA Zellen beobachtet werden. Diese Veränderungen wiesen deutliche Ähnlichkeiten mit den Mechanismen der TNF-induzierten Barrierestörung auf, wobei Unterschiede in der Kinetik auffielen (vgl. Abschnitt 3.1).

3.3 Transepitheliale elektrische Widerstände nach IFN- und kombinierter IFN/TNF-Behandlung

Aufgrund der Kongruenz der Beobachtungen sollte ein möglicherweise verstärkender Einfluss von KA RhoA auf die durch eine IFN/TNF-Behandlung induzierte Barrierestörung genauer untersucht werden. Hierfür wurden differenzierte Zellen analog zu den bereits durchgeführten Validierungsexperimenten (vgl. Abschnitt 3.1) initial für 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) vorbehandelt und anschließend für 8 Stunden mit IFN und TNF (5 ng/ml) in Kombination behandelt.

Nach Abschluss der Behandlung konnte zwischen Kontrollzellen (KA RhoA + dox) und KA RhoA Zellen (KA RhoA – dox), welche jeweils mit 10 ng/ml IFN behandelt wurden, kein Unterschied gemessen werden (Abbildung 3-9).

In den IFN/TNF-behandelten Kontrollzellen (RhoA-Expression ausgeschaltet; Medium mit Doxyzyklin) konnte jedoch erwartungsgemäß ein signifikanter Abfall des epithelialen Widerstandes auf $78,9 \pm 6,6$ % (Kontrolle + TNF; $p < 0,05$) von Kontrollzellen beobachtet werden. Induzierte man jedoch die Expression von konstitutiv aktivem RhoA, so ist dieser TEW-Abfall nach IFN/TNF-Gabe nicht zu detektieren bzw. nicht signifikant (Abfall auf $93,1 \pm 10,4$ %, $p = 0,27$ im Vergleich zu Kontrollzellen).

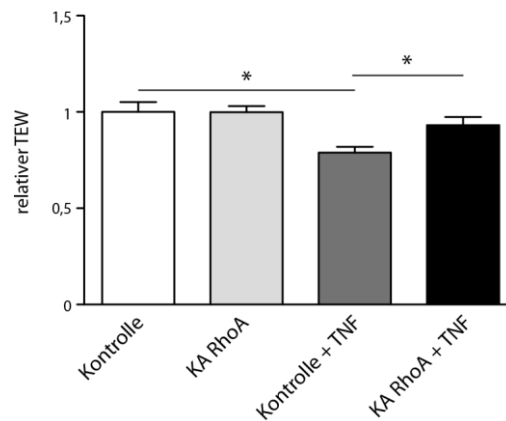


Abbildung 3-9 | Transepitheliale Widerstände nach IFN- und kombinierter IFN/TNF-Behandlung
 Dargestellt ist der relative TEW für Kontrollzellen (+ dox + 10 ng/ml IFN), für KA RhoA Zellen (- dox + 10 ng/ml IFN), für TNF-behandelte Kontrollzellen (+ dox + 10 ng/ml IFN und 5 mg/ml TNF) und für TNF-behandelte KA RhoA Zellen (- dox + 10 ng/ml IFN und 5 mg/ml TNF), welche für 24 Stunden mit 10 ng/ml vorbehandelt und anschließend für 8 Stunden unter den angegebenen Bedingungen behandelt wurden. (* $p < 0,05$; $n \geq 4$; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwertes dar)

Überraschenderweise konnte somit eine Verminderung des TEW-Abfalls nach der Induktion von konstitutiv aktivem RhoA in IFN/TNF-behandelten Zellen beobachtet werden. Da die in der Einleitung beschriebene RhoA/ROCK/MLCK/MLC-Signalkaskade übereinstimmend mit den Beobachtungen im hier etablierten induzierbaren Expressionssystem zu einer erhöhten Durchlässigkeit der *tight junctions* führt (Terry *et al.*, 2010; Totsukawa *et al.*, 2000; Vandenbroucke *et al.*, 2008), deutete dies auf die Existenz eines weiteren RhoA-aktivierten Signalweges hin, der im Kontext der TNF-induzierten Barrierdysfunktion eine protektive Rolle zu spielen scheint.

3.4 Der RhoA Effektor PKN wird nach kombinierter IFN- und TNF-Behandlung aktiviert

Die ubiquitär exprimierte RhoA Effektor Serin/Threonin Proteinkinase 1 (PKN) stellte ein geeignetes Kandidatenmolekül für den vermuteten Signalweg dar, da es neben seiner Beteiligung an der Regulation der Barrierefunktion im Mammaepithel (Fischer *et al.*, 2007) auch als Modulator von zwei zentralen inflammatorischen Signalwegen (NF- κ B und JNK), welche nach der Stimulation mit TNF aktiviert werden, identifiziert werden konnte (Kato *et al.*, 2008). In einem ersten Schritt sollte daher untersucht werden, ob die Behandlung intestinaler Epithelzellen mit einer Kombination aus IFN und TNF zu einer Aktivierung dieser Kinase führt. Für diese Untersuchungen wurde die humane Darmepithelzelllinie T84 benutzt,

welche aus einer Lungenmetastase eines Patienten mit einem kolorektalen Karzinom gewonnen wurde. Sie stellt ein geeignetes Modellsystem dar, da sie ähnlich wie Caco-2 Zellen Eigenschaften von nicht transformierten Epithelzellen aufweist, wie z.B. das Vorhandensein einer Polarität sowie die Ausbildung von *tight junctions*, Desmosomen und Mikrovilli (Dharmasathaphorn *et al.*, 1984).

Analog zu den Versuchen in Caco-2 Zellen wurden T84 Zellen daher für 24 Stunden mit IFN (2,5 ng/ml) vorbehandelt und anschließend für sechs Stunden mit IFN (2,5 ng/ml) und TNF (5 ng/ml) inkubiert. Abbildung 3-10A zeigt den signifikanten TEW-Abfall nach sechsstündiger TNF-Behandlung (Abfall auf $83,3 \pm 2,7 \%$, $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollzellen). Die TNF-Spezifität des gemessenen TEW-Abfalls konnte auch in diesem Modellsystem durch die Verwendung des humanen TNF-Antikörpers Adalimumab gezeigt werden.

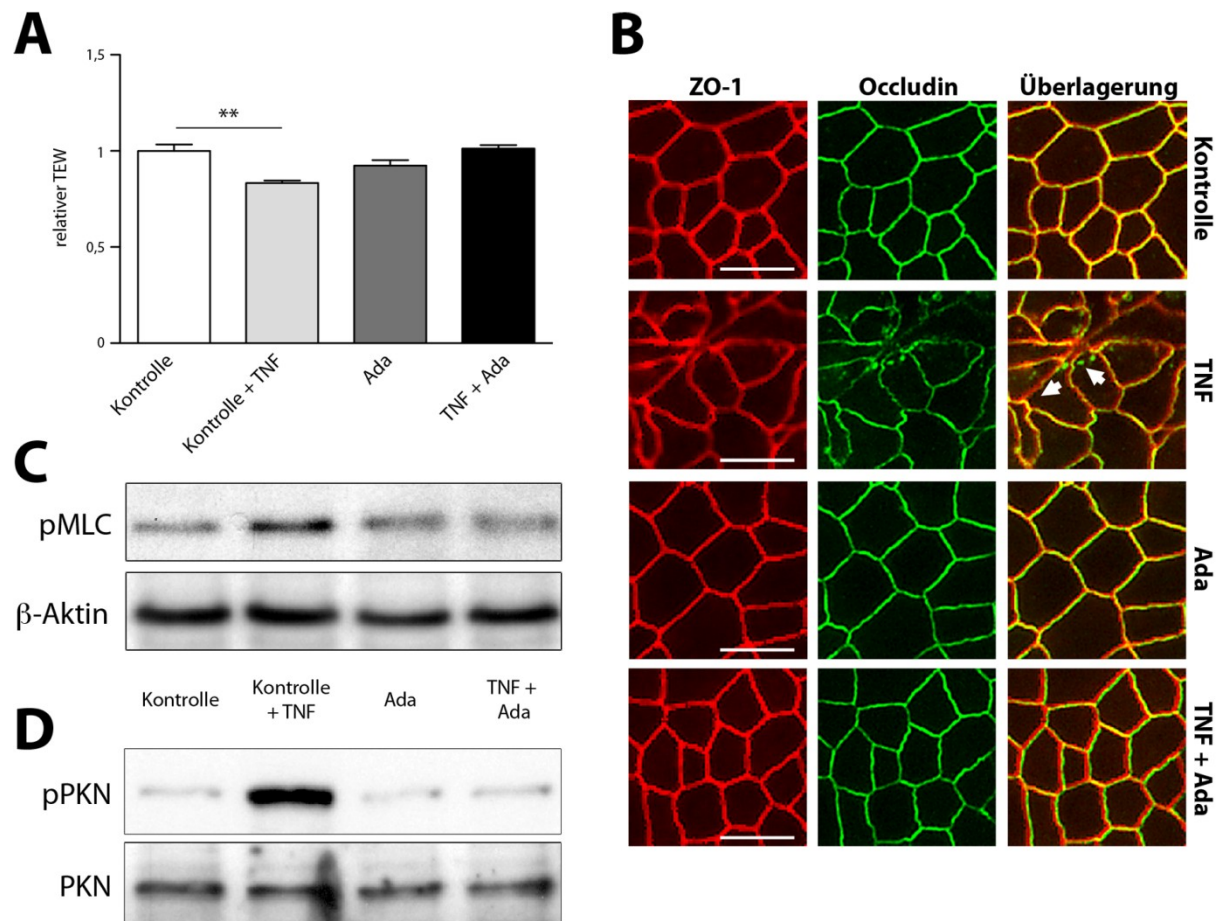


Abbildung 3-10 | Aktivierung von PKN nach kombinierter IFN- und TNF-Gabe A) Dargestellt ist der TEW für humane T84 Epithelzellen, die für 24 Stunden mit IFN (2,5 ng/ml) vorbehandelt und anschließend für weitere 6 Stunden mit IFN (2,5 ng/ml) und TNF (5 ng/ml) inkubiert wurden. (** $p < 0,01$; $n = 4$; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar) B) Indirekte Immunfluoreszenz für die *tight junction* Komponenten ZO-1 und Occludin für Kontroll- und IFN/TNF-behandelte Zellen. Die weißen Pfeile weisen auf Störungen der *tight junction* Architektur hin (6 h Behandlung, 2,5 ng/ml IFN + 5 ng/ml TNF). (weißer Maßstab: 10 μm) C) MLC-Phosphorylierungsniveau nach sechsstündiger IFN/TNF-Gabe. Als Ladekontrolle diente das ubiquitär

exprimierte β -Aktin. D) Phosphorylierungsniveau der RhoA Effektorkinase PKN nach 6-stündiger IFN/TNF-Gabe. Als Ladekontrolle diente PKN.

Indirekte Immunfluoreszenzanalysen zeigten mit Caco-2 Zellen vergleichbare morphologische Veränderungen der zellulären Architektur (vgl. Abschnitt 3.1), welche durch wellenförmige Modulationen der *tight junctions* sowie die Internalisierung von Occludin charakterisiert war (Abbildung 3-10B; weiße Pfeile). Mit Hilfe eines Western-Blots konnte neben der erwarteten Erhöhung des MLC-Phosphorylierungsniveaus nach TNF-Gabe (Abbildung 3-10C) zusätzlich demonstriert werden, dass diese funktionellen und morphologischen Veränderungen von einer PKN-Aktivierung begleitet wurden, die sich in einer vermehrten Phosphorylierung (Dong *et al.*, 2000; Flynn *et al.*, 2000) unter diesen experimentellen Bedingungen manifestierte (Abbildung 3-10D). Auch dieser Effekt war TNF-abhängig, denn in mit TNF und Adalimumab gleichzeitig behandelten Zellen konnte kein erhöhtes PKN-Phosphorylierungsniveau nachgewiesen werden. Somit konnte in diesen Experimenten eine Aktivierung von PKN durch TNF demonstriert werden.

3.5 Transepitheliale elektrische Widerstände nach gleichzeitiger Gabe von IFN/TNF und PKN-Inhibitoren

Wie in Abschnitt 3.3 dargestellt, konnte eine Verringerung des IFN/TNF-induzierten TEW-Abfalls nach Aktivierung von RhoA gezeigt werden. Interessanterweise wurde nach TNF-Gabe eine Aktivierung von PKN, einem RhoA-Effektor, beobachtet (siehe Abbildung 3-10D). Um erste Hinweise auf eine mögliche funktionelle Bedeutung dieser Beobachtung zu erlangen, wurde PKN mit Hilfe der chemischen Inhibitoren Bisindolylmaleimid I (Bis I) und Ro 31-8220 blockiert. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass beide Substanzen keine spezifischen PKN-Inhibitoren darstellen. Bezogen auf PKN hat Bisindolylmaleimid I eine IC_{50} von 0,2 μ M (Mukai und Ono, 2006); es blockiert jedoch neben PKN auch verschiedene Isoformen der strukturverwandten Proteinkinase C mit höherer Affinität (PKC; IC_{50} 0,03 μ M (Jacobson *et al.*, 1995)). Der Wirkstoff Ro 31-8220 weist für PKN eine IC_{50} von 0,03 μ M auf (Standaert *et al.*, 1998) und blockiert ebenfalls mehrere Isoformen von PKC mit höherer Affinität (IC_{50} 0,005 – 0,027 μ M (Wilkinson *et al.*, 1993)).

Wie in den vorherigen Experimenten wurden die T84 Zellen für 24 Stunden mit 2,5 ng/ml IFN vorbehandelt und anschließend sollten die Effekte der Inhibitorgabe (mit und ohne 5

ng/ml TNF) untersucht werden. Abbildung 3-11A zeigt den epithelialen Widerstand im Verlauf der Zeit nach Behandlungsstart.

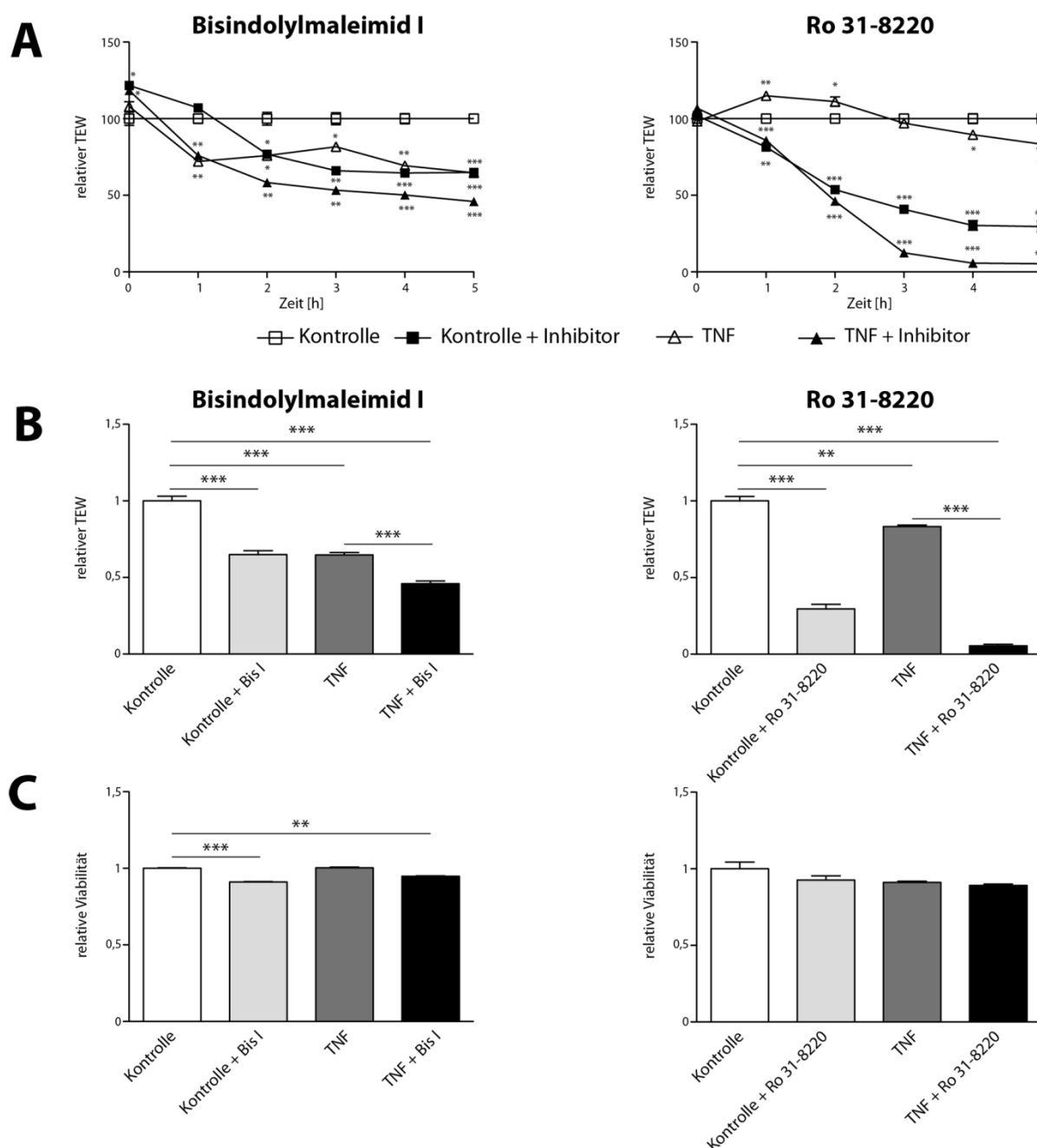


Abbildung 3-11 | Transepitheliale elektrische Widerstände nach gleichzeitiger Gabe von IFN/TNF und PKN-Inhibitoren A) Dargestellt ist der relative TEW in Abhängigkeit der Zeit für T84 Zellen, die für 24 Stunden mit IFN (2,5 ng/ml) vorbehandelt und anschließend für weitere 5 Stunden mit Bis I (10 μ M), Ro 31-8220 (10 μ M) und TNF (5 ng/ml), oder den jeweiligen Kombinationen behandelt wurden. B) Relative transepitheliale Widerstände und C) relative Viabilität nach einer fünfstündigen Behandlungsdauer. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n \geq 4$; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar)

In Abbildung 3-11B sind die gemessenen Widerstände nach Normierung auf die Kontrollgruppe (IFN) und einer Behandlungsdauer von fünf Stunden dargestellt. Bei alleiniger TNF-Behandlung kam es erwartungsgemäß zu einem signifikanten TEW-Abfall (Abfall auf $64,6 \pm 3,2 \%$, $p < 0,001$ und auf $83,3 \pm 2,7 \%$, $p < 0,01$ im Vergleich zu Kontrollzellen). Betrachtet man nur die Inhibitoren, so kam es bei beiden Inhibitoren zu einer hochsignifikanten Verringerung des gemessenen Widerstandes nach Inhibitorgabe in Zellen, die nur mit IFN und dem jeweiligen Inhibitor behandelt wurden (bei $10 \mu\text{M}$ Bis I auf $64,9 \pm 5,1 \%$, $p < 0,001$ und bei $10 \mu\text{M}$ Ro 31-8220 auf $29,6 \pm 6,9 \%$, $p < 0,001$).

In Zellen, die mit IFN/TNF und dem jeweiligen Inhibitor behandelt wurden, kam es zu einer weiteren Verschlechterung der Barrierefunktion, welche durch einen TEW-Abfall unter die gemessenen Widerstände der anderen Gruppen charakterisiert war (bei TNF + Bis I auf $46 \pm 3,3 \%$, $p < 0,001$ und bei TNF + Ro 31-8220 auf $5,3 \pm 1,3 \%$, $p < 0,001$).

Um zu überprüfen, ob diese Verschlechterung des epithelialen Widerstandes eine Folge verringerter Zellviabilität ist, wurde ein Viabilitätsassay unter gleichen Bedingungen durchgeführt (Abbildung 3-11C). Mit Hilfe dieses Ansatzes konnte eine signifikante Verringerung der Viabilität in Bisindolylmaleimid I-behandelten Zellen beobachtet werden (Abnahme der viablen Zellen auf $91,1 \pm 2,2 \%$, $p < 0,001$ in Bis I und auf $94,8 \pm 2,8 \%$, $p < 0,01$ in TNF + Bis I-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen), wohingegen in Ro 31-8220-behandelten Zellen keine signifikante Abnahme der Anzahl an viablen Zellen nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend fand sich damit in diesen Experimenten mit zwei unspezifischen PKN-Inhibitoren eine deutliche Zunahme der *tight junction* Permeabilität sowohl in TNF-behandelten Zellen als auch in Zellen, die lediglich mit IFN stimuliert wurden, wobei diese Veränderungen zumindest für Ro 31-8220 nicht allein auf einen zytotoxischen Effekt zurückzuführen sind. Diese Ergebnisse gaben damit erste Hinweise auf eine mögliche protektive Rolle von PKN im Kontext der TNF-induzierten Barriestörung, ließen aber aufgrund der fehlenden Spezifität der verwendeten Inhibitoren keine abschließende Beurteilung zu.

3.6 Spezifische Inhibition von PKN mit dem Inhibitorpeptid PRL

Während der Arbeiten an dieser Dissertation publizierte die Arbeitsgruppe um H. Mukai ein spezifisches PKN-Inhibitorpeptid (PRL; IC_{50} $0,7 \mu\text{M}$), welches nur PKN, aber nicht das

strukturverwandte PKC inhibiert, indem es nicht an die Kinasedomäne bindet, die zwischen beiden Proteinen eine hohe Homologie aufweist, sondern durch Interferenz mit der PKN-spezifischen regulatorischen Domäne wirkt (Shiga *et al.*, 2010). Um zu überprüfen, ob die beobachteten Effekte einer PKN-Inhibition unter Verwendung dieses spezifischen Inhibitorpeptides bestätigt werden können, wurden wiederum T84 Zellen nach dem gleichen Schema behandelt (siehe Abschnitt 3.5). Abweichend zur vorherigen Vorgehensweise war allerdings unmittelbar vor der TNF- bzw. TNF + PRL-Behandlung eine zweiminütige Pyrenebutyrat-Präinkubation für die direkte Membrantranslokation des Peptides notwendig (Takeuchi *et al.*, 2006).

Abbildung 3-12A zeigt, dass bereits nach einer einstündigen kombinierten TNF + PRL-Behandlung ein signifikanter Abfall des epithelialen Widerstandes im Vergleich zu den mit einem Kontrollpeptid behandelten Zellen beobachtet werden konnte (Abfall auf $59,3 \pm 11,9$ %, $p < 0,05$). Nach zwei Stunden war der TEW-Abfall dieser Gruppe auch gegenüber Zellen, welche mit dem Kontrollpeptid und TNF behandelt wurden, signifikant (Abfall auf $69,5 \pm 12,9$ %, $p < 0,05$). In Abbildung 3-11B sind die nach fünf Stunden Inkubation ermittelten Widerstände dargestellt.

Beachtenswert ist die Tatsache, dass im gesamten beobachteten Zeitraum die alleinige Gabe des spezifischen PKN-Inhibitors, im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Gabe von Bis I bzw. Ro 31-8220 (vgl. Abbildung 3-11A und B), keine Auswirkungen auf die gemessenen Widerstände hatte. Die unter der simultanen Verwendung von TNF und PRL erhobenen Daten bestätigten jedoch die Beobachtungen in der Bis I bzw. Ro 31-8220 + TNF-Gruppe (vgl. Abbildung 3-11A und B).

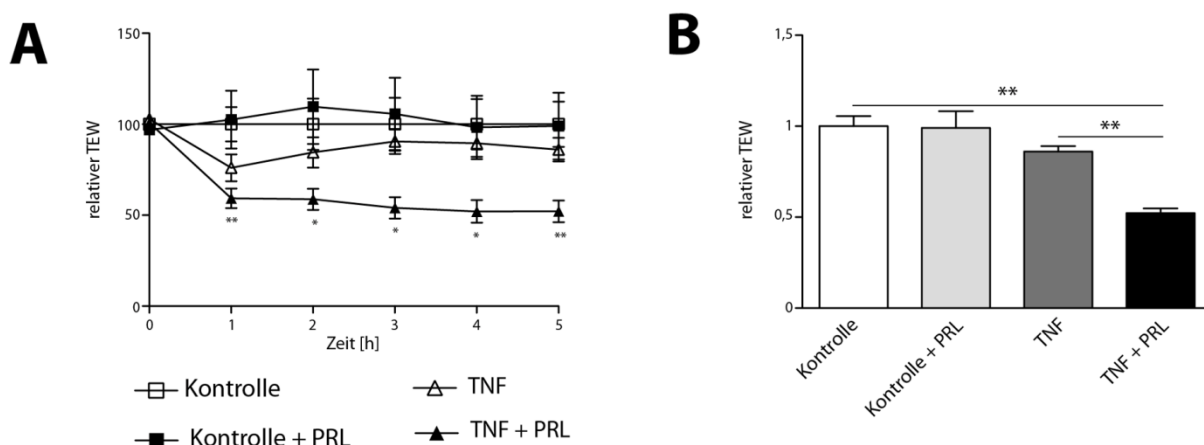


Abbildung 3-12 | Spezifische PKN-Inhibition mittels des Inhibitorpeptides PRL Dargestellt ist der relative TEW in Abhängigkeit der Zeit für T84 Zellen, die für 24 Stunden mit IFN (2,5 ng/ml) vorbehandelt und anschließend für weitere 5 Stunden mit PRL (10 μ M), TNF (5 ng/ml), oder PRL +

TNF kultiviert wurden. B) Relative transepitheliale Widerstände nach einer fünfstündigen Behandlungsdauer. (*p < 0,05; **p < 0,01; n ≥ 4; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar)

Zusammenfassend resultierte die spezifische Inhibition von PKN in einer Verstärkung der TNF-induzierten Barriestörung, welche durch geringere gemessene transepitheliale Widerstände im Vergleich zu Kontrollzellen nach der Behandlung mit IFN und TNF charakterisiert war.

3.7 Etablierung eines induzierbaren Expressionssystems für konstitutiv aktives und dominant negatives PKN

Die zuvor erhobenen Daten lieferten Hinweise auf eine mögliche protektive Funktion von PKN nach TNF-Gabe. Um eine mögliche Rolle von PKN bei der zellulären IFN/TNF-Antwort unter Umgehung des problematischen Inhibitoreinsatzes genauer untersuchen zu können, wurden analog zum pBI-L-RhoA-Konstrukt induzierbare dominant negative (DN) und konstitutiv aktive (KA) PKN-Konstrukte generiert.

3.7.1 Klonierung einer konstitutiv aktiven und dominant negativen PKN-Mutante und Validierung der induzierbaren Expression

Beide PKN-Konstrukte lagen aus vorherigen, im Labor durchgeführten Arbeiten im pcDNA4/TO Vektor vor. Die KA PKN-Mutante (PKN KD) konnte über einen NotI/XhoI Restriktionsverdaus in den mit NotI/SalI geschnittenen Vektor eingebracht werden. Für diese Klonierungen wurden die verwendeten Restriktionsenzyme so gewählt, dass nichtkompatible, überhängende Enden generiert und damit die Insertion des jeweiligen Konstruktes in der korrekten Orientierung gewährleistet war. Für die Klonierung des DN PKN-Konstrukts (PKN T774A) musste ein alternativer Ansatz gewählt werden, da das einzig mögliche Vorgehen (PKN T774A-pcDNA4/TO mit PmeI geschnitten; pBI-L mit EcoRV) glatte Enden generierte. Die ordnungsgemäße Orientierung des klonierten Konstruktes wurde unter diesen Bedingungen nach Abschluss der Klonierung mit Hilfe eines PstI-Kontrollverdaus gesichert (Daten nicht gezeigt).

Analog zum Vorgehen bei der Generierung des RhoAG14V-Konstruktes dienten kompetente DH5α *E.coli* Bakterien als Rezipientenstamm für die PKN-pBI-L-Konstrukte. Die

Nukleotidsequenzen wurden ebenfalls nach Abschluss der Klonierungsarbeiten durch Sequenzierungsanalysen auf Korrektheit überprüft. Eine graphische Übersicht der generierten konstitutiv aktiven und dominant negativen PKN-pBI-L-Konstrukte ist in Abbildung 3-13 dargestellt.

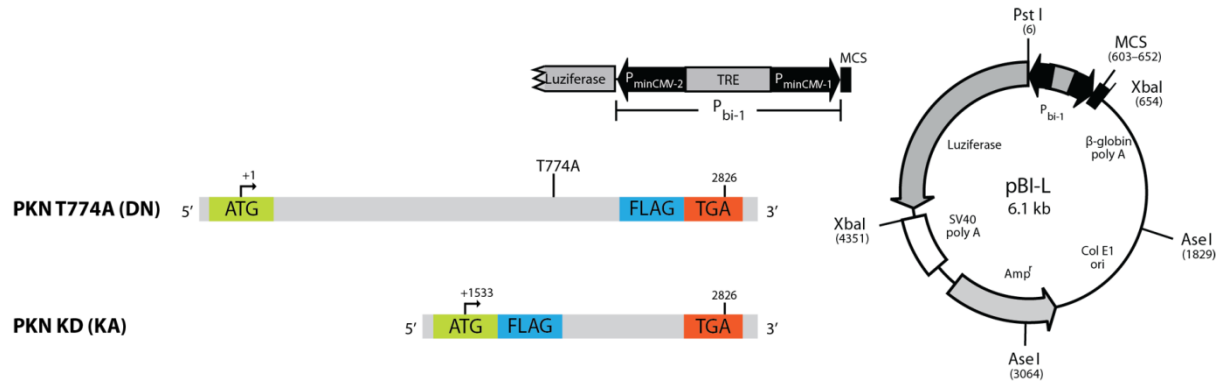


Abbildung 3-13 | Übersicht über die verwendeten PKN-Konstrukte Dargestellt sind die konstitutiv aktiven und dominant negativen PKN-Konstrukte, welche in den pBI-L Vektor der Firma Clontech subkloniert wurden. Start- und Stopcodon sowie das FLAG-Epitop sind farblich markiert und an ihrer korrekten Position eingezeichnet. Die Zahlen über dem jeweiligen Konstrukt kennzeichnen die Länge in Basenpaaren. Zusätzlich sind die im dominant negativen Mutanten ausgetauschten Aminosäuren dargestellt. KA: konstitutiv aktiv, DN: dominant negativ.

Für die Expressionsvalidierung wurden 67 Klone analysiert und in Abbildung 3-14 sind exemplarisch die beiden für alle weiteren Analysen verwendeten Zellklone dargestellt. Abbildung 3-14A zeigt dabei die Luziferase-Expression vor und nach Doxyzyklin-Entzug aus dem Kulturmedium (KA PKN: - dox = 163 ± 4 RLU, - dox = 174430 ± 103365 RLU, Induktionsfaktor ~ 1070 ; DN PKN: + dox = 14455 ± 3903 RLU, - dox = 4281333 ± 371653 RLU, Induktionsfaktor ~ 296). Zusätzlich wurde auch in diesen Zellklonen die Expression der jeweiligen Zielgene auf Proteinebene per Western-Blot nachgewiesen (Abbildung 3-14B). Ein direkter Nachweis der PKN-Expression mit Hilfe des anti-FLAG-Antikörpers war aufgrund der limitierten Spezifität dieses Antikörpers nicht möglich, weshalb eine Immunpräzipitation mit diesem Antikörper, gefolgt von einem Western-Blot mit einem anti-PKN-Antikörper, durchgeführt wurde.

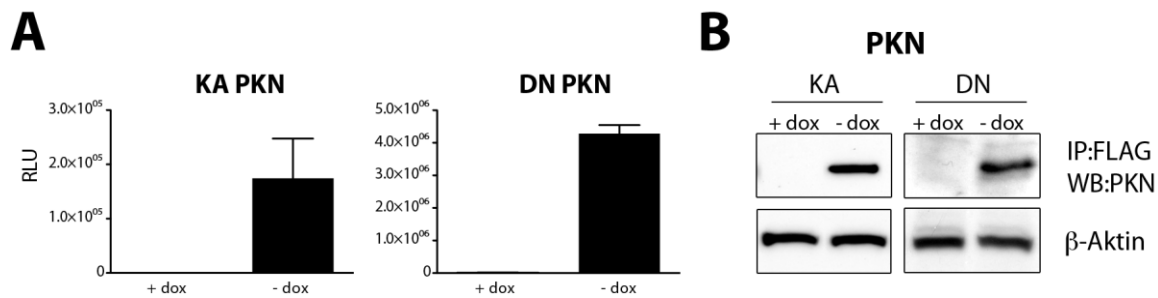


Abbildung 3-14 | Expressionsvalidierung und -analyse der im Rahmen der Doktorarbeit etablierten PKN-pBI-L-Konstrukte A) Luciferase-Expression in Zellklonen nach 48-stündiger Kultivierung in Medium mit (100 ng/ml) und ohne Doxyzyklinzusatz. (Duplikatmessung; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar) B) Expressionsniveau auf Proteinebene nach 48-stündiger Inkubation in Medium mit (100 ng/ml) und ohne Doxyzyklin. Die Präzipitation erfolgte mit einem anti-FLAG-Antikörper und der nachfolgende Western-Blot wurde mit einem anti-PKN-Antikörper durchgeführt. Als Ladekontrolle diente β -Aktin.

Mit dieser Methode konnte auch für die PKN-Klone eine gute Induzierbarkeit bei minimaler Basalexpression nachgewiesen werden und ebenso waren die PKN-Expressionsanalysen unter unabhängigen Bedingungen reproduzierbar.

3.8 Transepitheliale elektrische Widerstände nach kombinierter IFN- und TNF-Behandlung in KA und DN PKN exprimierenden Zellen

Entsprechend dem Vorgehen in den zuvor untersuchten Caco-2 Zellen wurden die zu analysierenden Zellklone erst nach dem Abschluss der Differenzierungsperiode für Experimente benutzt. Nach einer 24-stündigen IFN-Vorbehandlung (10 ng/ml) folgte die Gabe von IFN (10 ng/ml) und TNF (5 ng/ml) in Kombination. Abbildung 3-15A zeigt im beobachteten Zeitraum von fünf Stunden einen nicht signifikanten Abfall des gemessenen transepithelialen Widerstandes in TNF-behandelten Zellen, in denen die Expression von DN PKN ausgeschaltet (DN PKN TNF + dox) war (TEW-Abfall nach 5 h auf $76,3 \pm 3,9 \%$, $p = 0,2$ im Vergleich zu Kontrollzellen). In dominant negatives PKN exprimierenden Zellen (DN PKN TNF - dox) konnte eine zusätzliche, signifikante Verringerung des Widerstandes nach TNF-Behandlung gemessen werden (TEW-Abfall auf $45,5 \pm 7,4 \%$, $p < 0,05$ im Vergleich zu Kontrollzellen). Dieser Abfall war im gleichbehandelten KA PKN Zellklon weder in nicht induzierten (KA PKN TNF + dox) noch in induzierten Zellen (KA PKN TNF - dox) zu beobachten (Abbildung 3-15A).

In einem unabhängigen Experiment konnte nach einer Verlängerung der IFN/TNF-Inkubationszeit auf 24 Stunden in dominant negatives PKN exprimierenden Zellen (- dox) im

Vergleich zu ebenfalls mit TNF behandelten Kontrollzellen (+ dox) ein signifikant geringerer epithelialer Widerstand (TEW $53,7 \pm 4,4 \%$, $p < 0,05$) gemessen werden (Abbildung 3-15B). Im Gegensatz zu dieser Beobachtung war der TEW in konstitutiv aktives PKN exprimierenden Zellen nach 24-stündiger TNF-Inkubation signifikant höher ($115,3 \pm 5,5 \%$, $p < 0,05$) als in Kontrollzellen (+ dox).

Somit konnten in diesen Experimenten die Beobachtungen nach Einsatz von PKN/PKC-Inhibitoren (Abschnitt 3.5) sowie dem spezifischen Inhibitorpeptid PRL (Abschnitt 3.6) mit Hilfe des induzierbaren Expressionssystems bestätigt werden.

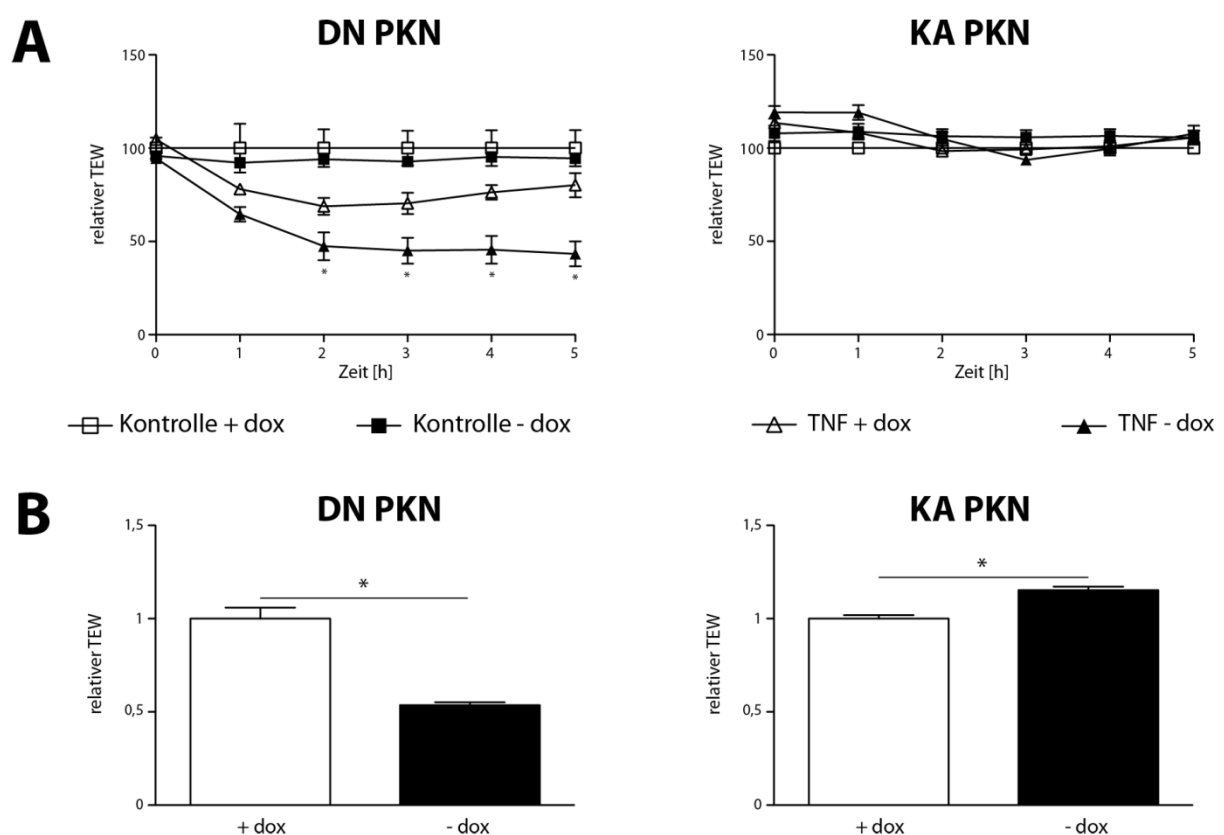


Abbildung 3-15 | Transepitheliale elektrische Widerstände in KA und DN PKN exprimierenden Zellklonen nach kombinierter IFN/TNF-Behandlung A) Dargestellt ist der relative TEW in Abhängigkeit der Zeit sowohl für Kontrollzellen als auch für KA und DN PKN exprimierende Zellen, die für 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) vorbehandelt und anschließend für weitere fünf Stunden mit IFN (10 ng/ml) und TNF (5 ng/ml) behandelt wurden. B) Relative transepitheliale Widerstände nach einer 24-stündigen TNF-Behandlungsdauer. (* $p < 0,05$; $n \geq 3$; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar)

Die kombinierte Gabe von IFN und TNF führte im DN PKN Zellklon zu einer signifikanten Verschlechterung der Barrierefunktion nach 24 Stunden, welche durch einen verringerten transepithelialen elektrischen Widerstand charakterisiert war. Im Gegensatz dazu konnte im

KA PKN exprimierenden Zellklon eine signifikante Verbesserung des TEW nach Gabe von TNF im Vergleich zu Kontrollzellen beobachtet werden (Abbildung 3-15B).

3.9 Transepitheliale elektrische Widerstände nach Inhibition von PKN mittels Ro 31-8220 und gleichzeitiger Expression von DN oder KA PKN

Die bisher erhobenen Daten deuteten darauf hin, dass die Hemmung von PKN zu einer Verstärkung des TNF-Effekts führt. Demzufolge schienen die Ergebnisse der PKN/PKC-Inhibitoren-Experimente (Abschnitt 3.5) tatsächlich den Effekt einer PKN-Inhibition widerzuspiegeln. Um diese Annahme spezifisch zu testen, wurden KA und DN PKN exprimierende Zellen mit dem zuvor verwendeten (siehe Abbildung 3-11) chemischen PKN/PKC-Inhibitor Ro 31-8220 und IFN/TNF behandelt.

Unter Verwendung von Ro 31-8220 war in Zellen mit ausgeschalteter DN PKN-Expression (Kontrolle + Ro 31-8220) nach acht Stunden TNF-Behandlung ein signifikanter Abfall des TEW (auf $39,5 \pm 4,2$ %, $p < 0,01$) im Vergleich zu Kontrollzellen (IFN + TNF) zu beobachten (Abbildung 3-16). Diese Beobachtungen bestätigten die zuvor erhobenen Daten (siehe Abbildung 3-11).

Schaltete man zusätzlich die Expression von DN PKN an (DN PKN + Ro 31-8220), so war keine weitere Verringerung des Widerstandes zu messen (TEW-Abfall auf $37,7 \pm 5,3$ %, $p < 0,01$ von Kontrollzellen). Beachtenswert ist der parallele Kurvenverlauf bei Ro 31-8220 behandelten Kontrollzellen und bei ebenfalls mit Ro 31-8220 behandelten, aber gleichzeitig auch dominant negatives PKN exprimierenden Zellen (Abbildung 3-16A). Das zusätzliche Ausschalten von PKN mit Hilfe der DN PKN-Mutante führte somit nicht zu einer weiteren Abnahme des gemessenen TEW. Zum gewählten acht Stunden Zeitpunkt war der TEW-Abfall (auf $81,4 \pm 5,3$ %, $p = 0,06$ im Vergleich zu Kontrollzellen) bei alleiniger Expression der dominant negativen PKN-Variante erkennbar, jedoch nicht signifikant (Abbildung 3-16A).

In einem gleichbehandelten Zellklon mit ausgeschalteter Expression von konstitutiv aktivem PKN kam es ebenfalls zu einem TEW-Abfall nach Ro 31-8220-Gabe (Kontrolle + Ro 31-8220), der statistisch jedoch nicht signifikant war (TEW-Abfall auf $75,6 \pm 4,7$ %, $p = 0,1$; Abbildung 3-16B). Im Gegensatz zu den DN PKN exprimierenden Zellen waren konstitutiv aktives PKN exprimierende Zellen in der Lage, den Ro 31-8220 induzierten TEW-Abfall zu kompensieren (KA PKN + Ro 31-8220; Abbildung 3-16B), beziehungsweise konnte in diesen Zellen ein signifikant höherer epithelialer Widerstand gemessen werden (TEW $101,2 \pm 6,4$ %

im Vergleich zu Kontrollzellen; $133,9 \pm 8,5 \%$, $p < 0,05$ im Vergleich zu mit Ro 31-8220-behandelten Kontrollzellen; Abbildung 3-16B).

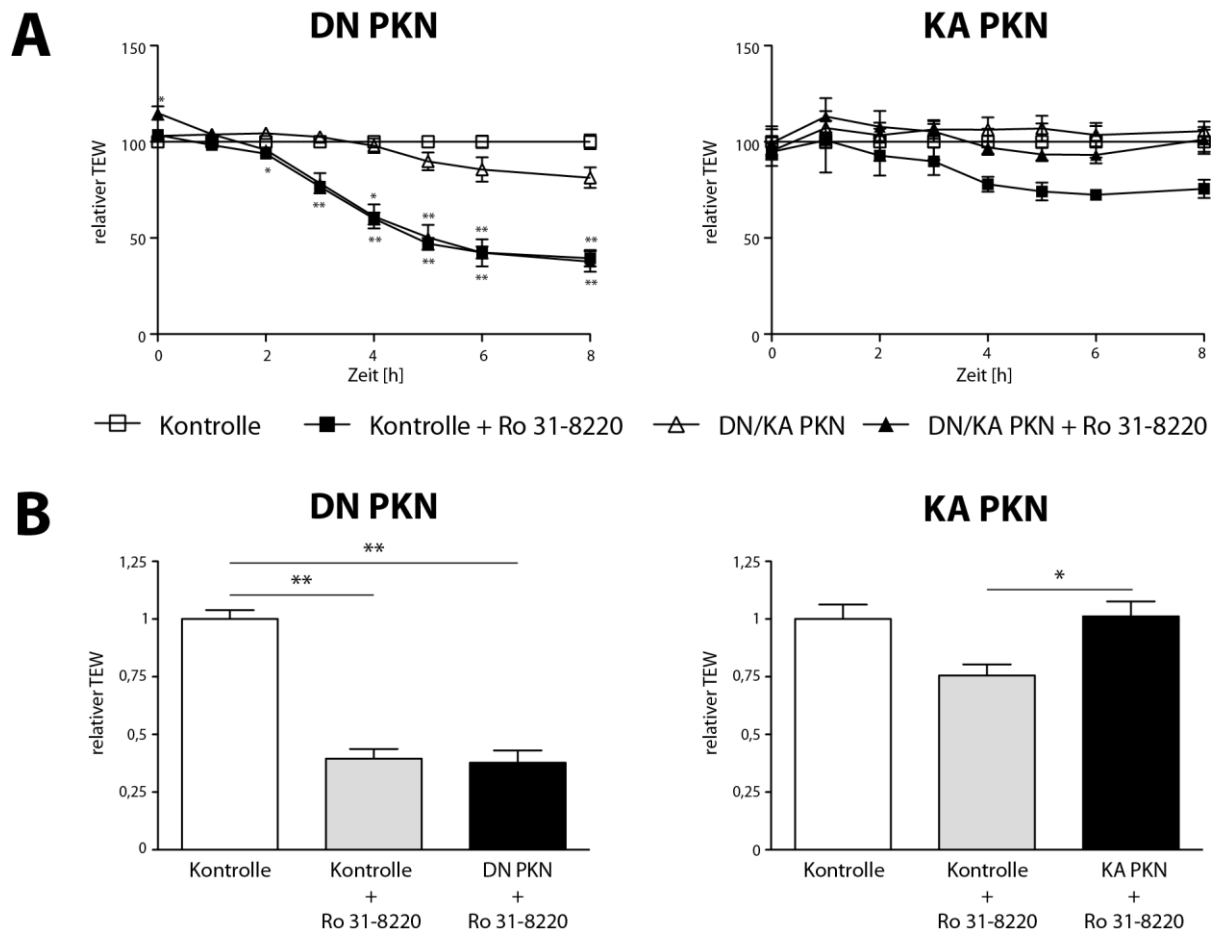


Abbildung 3-16 | Transepitheliale elektrische Widerstände nach Inhibition von PKN mittels Ro 31-8220 und gleichzeitiger Expression von DN oder KA PKN Dargestellt ist der relative TEW in Abhängigkeit der Zeit sowohl für Kontrollzellen als auch für KA und DN PKN exprimierende Zellen, die für 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) vorbehandelt und anschließend für weitere acht Stunden mit der Kombination IFN (10 ng/ml) und TNF (2,5 ng/ml) behandelt wurden (jeweils mit und ohne Ro 31-8220 (10 μ M)). B) Relative transepitheliale Widerstände nach einer achtstündigen Behandlungsdauer. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; $n = 3$; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar)

Zusammenfassend lässt sich somit feststellen, dass der Ro 31-8220-induzierte TEW-Abfall nach IFN/TNF-Behandlung in KA PKN Zellklonen nicht beobachtet werden konnte, was nahelegt, dass der Inhibitoreffekt PKN und nicht PKC-vermittelt ist. Konsistent hiermit konnte keine zusätzliche Verminderung der Barrierefunktion nach kombinierter Expression von DN PKN und Ro 31-8220-Gabe gemessen werden. Ein synergistischer Effekt war somit unter den gegebenen Bedingungen nicht nachweisbar.

3.10 Ionenpermeabilität in DN PKN und KA PKN exprimierenden Zellen

Die zuvor beobachteten Effekte nach Expression der beiden PKN Konstrukte bei gleichzeitiger Gabe von TNF fanden größtenteils innerhalb von fünf bis maximal 24 Stunden statt, was eine Beteiligung des *leak pathways*, welcher an der akuten Regulation der epithelialen Barrierefunktion beteiligt ist (Shen *et al.*, 2011), vermuten ließ. Zur genaueren Charakterisierung, ob dominant negatives oder konstitutiv aktives PKN die Fähigkeit zur Modulation des *leak pathways* besitzt, d.h. die Passage von Ionen mit einem Durchmesser von größer als 4 Ångström ($1 \text{ Å} = 0,1 \text{ nm}$) beeinflussen kann (Van Itallie *et al.*, 2008), wurden elektrophysiologische Ionenpermeabilitätsmessungen durchgeführt, die auf Grundlage von Verdünnungspotenzialen die Berechnung der größenspezifischen Permeabilität ermöglicht (Yu *et al.*, 2009).

Abbildung 3-17A zeigt die Ionenpermeabilität von IFN-vorbehandelten Kontrollzellen (KA PKN Zellen in Medium mit Doxyzyklin kultiviert) vor und nach TNF-Gabe.

Erwartungsgemäß konnte eine Erhöhung der Permeabilität nach einer TNF-Behandlungsdauer von fünf Stunden gemessen werden. Die Permeabilität war für alle untersuchten Ionen erhöht, wobei nur für TEA (6,58 Å; Erhöhung auf $138,2 \pm 27,9 \%$, $p < 0,05$ im Vergleich zu IFN-behandelten Kontrollzellen) und NMDG (7,29 Å; Erhöhung auf $162 \pm 21,8 \%$, $p < 0,05$ im Vergleich zu IFN-behandelten Kontrollzellen) das Signifikanzniveau erreicht wurde.

In einem nächsten Schritt wurde der Einfluss der KA PKN-Expression auf die Permeabilität untersucht. Abbildung 3-17B zeigt, dass die KA PKN-Induktion in IFN-behandelten Zellen keine Auswirkungen bezüglich einer veränderten Permeabilität zur Folge hatte. Es konnte jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen in Kontrollzellen nach Expressionsinduktion der konstitutiv aktiven PKN-Mutante in TNF-behandelten Zellen keine Erhöhung gemessen werden; die Gabe von TNF hatte somit auf die Permeabilität der untersuchten Ionen keine Auswirkungen mehr (vgl. Abbildung 3-17A mit 3-17C). Somit konnten in diesen Experimenten die Ergebnisse der TEW-Messungen (Abbildung 3-15) mit einem unabhängigen experimentellen Ansatz bestätigt werden.

Im Gegensatz dazu konnte im dominant negatives PKN exprimierenden Zellklon eine statistisch signifikante Erhöhung der Permeabilität gegenüber Kontrollzellen nach TNF-Behandlung für fünf der sechs untersuchten Ionen (MA - 3,78 Å: $127,8 \pm 9,8 \%$, $p < 0,05$; EA - 4,58 Å: $134,5 \pm 9,5 \%$, $p < 0,05$; TMA - 5,5 Å: $139,7 \pm 10,4 \%$, $p < 0,05$; TEA - 6,58 Å: $139 \pm 9,6 \%$, $p < 0,05$; NMDG - 7,29 Å: $138,5 \pm 10,7 \%$, $p < 0,05$) beobachtet werden

(Abbildung 3-17E). Auch in diesem Klon resultierte die Induktion von DN PKN ohne begleitende TNF-Stimulation nicht in einer erhöhten Permeabilität (Abbildung 3-17D).

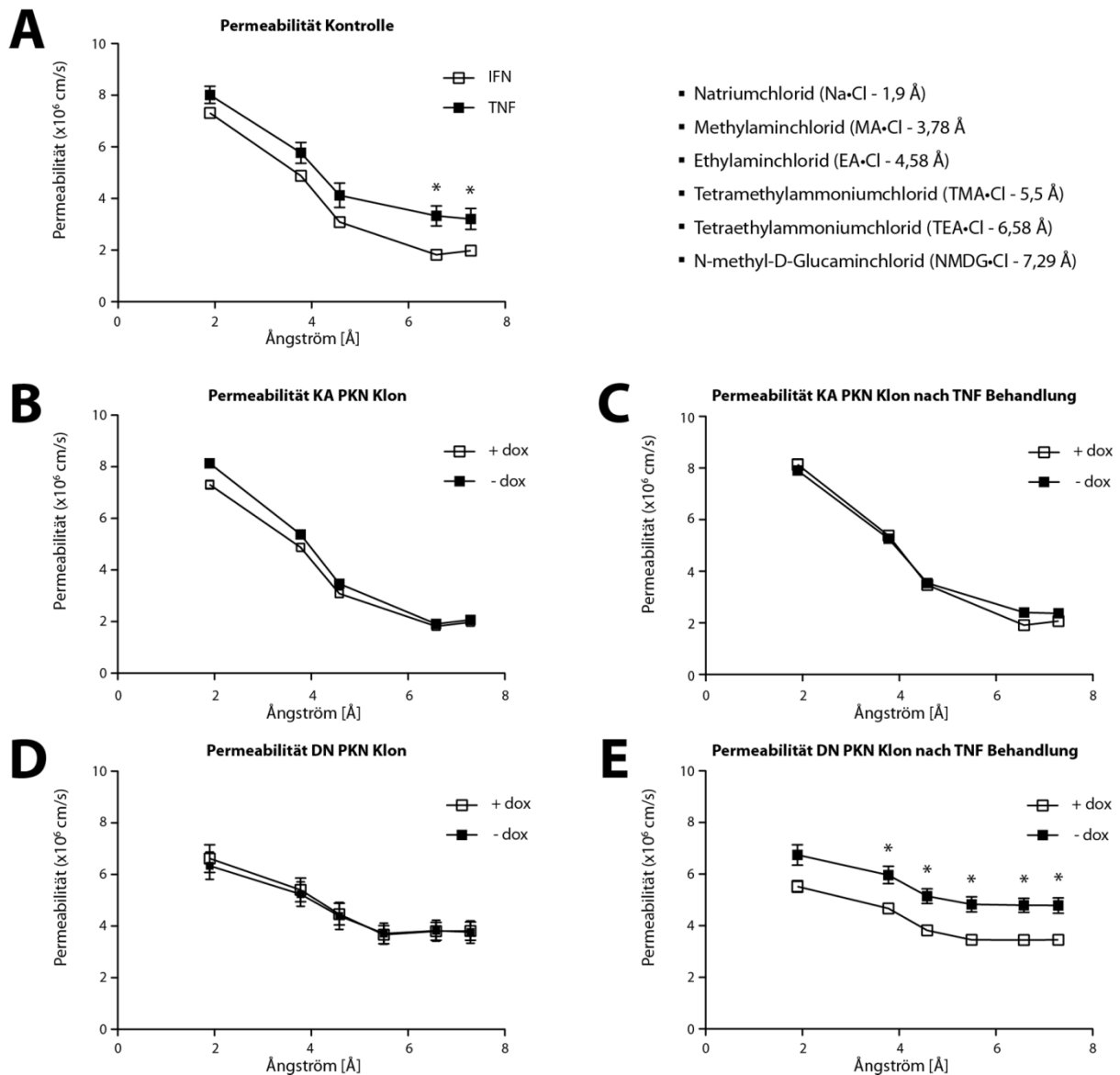


Abbildung 3-17 | Ionenpermeabilität in DN PKN und KA PKN exprimierenden Zellen Dargestellt sind die Permeabilitäten in Abhängigkeit der Ionengröße (angegeben in Ångström) sowohl für Kontrollzellen als auch für KA und DN PKN exprimierende Zellen die für 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) vorbehandelt und anschließend für weitere 4 (DN) und 5 (KA) Stunden nur mit IFN (10 ng/ml) oder mit der Kombination IFN (10 ng/ml) und TNF (2,5 ng/ml) behandelt wurden. A) Permeabilitäten von Kontrollzellen (KA PKN + dox) vor und nach der Gabe von TNF. B) Vergleich von Kontroll- (+ dox) und KA PKN (- dox) Zellen, die nicht mit TNF behandelt wurden. C) Vergleich von Kontroll- (+ dox) und KA PKN (+ dox) Zellen vor und nach der Gabe von TNF. D) Vergleich von Kontroll- (+ dox) und DN PKN (- dox) Zellen, die nicht mit TNF behandelt wurden. E) Vergleich der Permeabilitäten von Kontrollzellen (+ dox) und DN PKN Zellen (- dox) nach der Gabe von IFN und TNF in Kombination. (*p < 0,05; n = 3; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar)

Somit konnte eine nicht-ionenselektive Erhöhung der Permeabilität nach Induktion der DN PKN-Expression in IFN/TNF-behandelten Zellen gezeigt werden (Abbildung 3-17E), was darauf hindeutete, dass die beobachteten Effekte tatsächlich *leak pathway*-vermittelte Effekte sind und keine Veränderungen des *pore pathways* reflektieren, da dieser nur die Permeabilitäten von Ionen mit einem Durchmesser von kleiner als 4 Ångström beeinflusst (Van Itallie *et al.*, 2008). Dieses Ergebnis und die Beobachtung, dass die Expression von KA PKN eine Erhöhung der Permeabilität verhindern konnte (Abbildung 3-17C), lieferten somit weiterhin Hinweise auf eine protektive Rolle von PKN bei der zellulären Antwort auf die IFN/TNF-Gabe.

3.11 Charakterisierung der beteiligten Signaltransduktionswege nach IFN/TNF-Behandlung

Aufgrund der erhöhten Ionenpermeabilität nach Induktion des DN PKN Zellklons, welche schon nach einer fünfstündigen TNF-Behandlung zu messen war, sollte untersucht werden, welche Signaltransduktionskaskaden in den untersuchten Zellklonen in die Regulation der epithelialen Barrierefunktion involviert sind. Eine Beteiligung des MLCK/MLC-Signalweges an der Regulation des *leak pathways* nach TNF-Gabe konnte bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden (Weber *et al.*, 2010).

Aufgrund dessen sollte in einem nächsten Schritt diese vermutete Beteiligung verifiziert werden. Dazu wurden konstitutiv aktive und dominant negative PKN-Varianten auf semipermeablen Filtern ausgesät und nach abgeschlossener Differenzierung für 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) vor- und darauf folgend mit IFN (10 ng/ml) und TNF (5 ng/ml) behandelt. An verschiedenen Zeitpunkten der Behandlung wurden Zellen lysiert, aus diesen Zellen Gesamtprotein mit Hilfe von RIPA Extraktionspuffer isoliert und ein Tricin-Western-Blot durchgeführt.

Vergleicht man das MLC-Phosphorylierungsniveau von dominant negatives PKN exprimierenden Zellen (- dox) mit Kontrollzellen (+ dox), so war eine verstärkte Phosphorylierung in DN PKN Zellen sowohl zwei als auch vier Stunden nach Beginn der IFN/TNF-Behandlung zu beobachten (Abbildung 3-18A). Zum Zeitpunkt null war eine Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus nicht nachweisbar, da die Ladekontrolle (MLC) eine höhere Menge an geladenem Proteinextrakt für die – dox Probe signalisierte. Betrachtet man korrespondierend dazu den konstitutiv aktiven PKN Klon, so war in diesem Klon (- dox)

keine Erhöhung der MLC-Phosphorylierung mit zunehmender TNF-Behandlungsdauer im Vergleich zu Kontrollzellen (+ dox) zu detektieren (Abbildung 3-18B). In diesem Klon konnte außerdem eine Verringerung der MLC-Phosphorylierung im untersuchten Zeitraum beobachtet werden (Vergleich 0, 2 und 4 Stunden in KA PKN Zellen; Abbildung 3-18B).

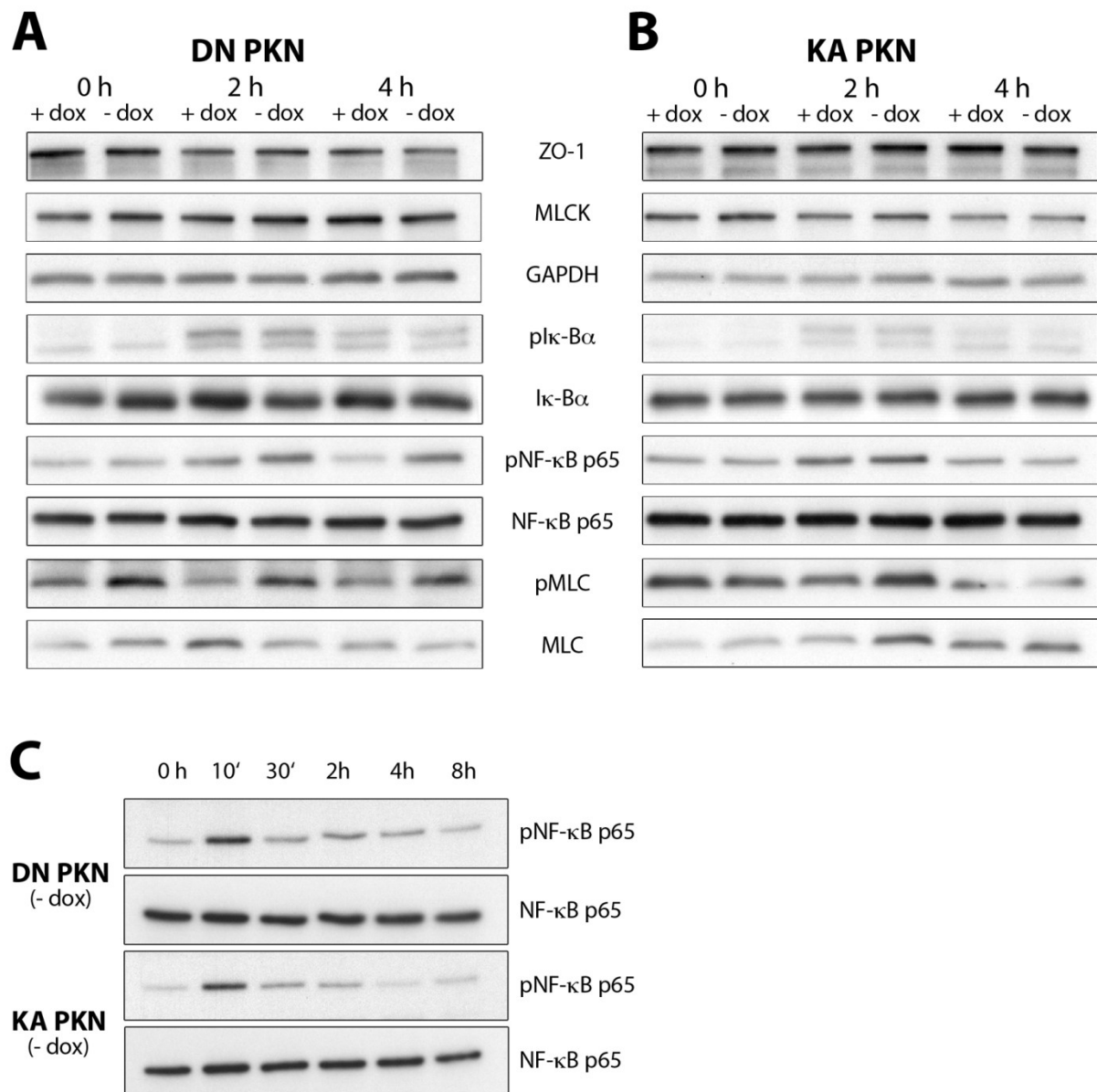


Abbildung 3-18 | Charakterisierung der beteiligten Signaltransduktionswege nach IFN/TNF-Behandlung in DN und KA PKN exprimierenden Zellen Dargestellt sind die Expressions- bzw. Phosphorylierungsniveaus ausgewählter Proteine sowohl für Kontrollzellen (+ dox) als auch für A) DN und B) KA PKN exprimierende Zellen (- dox), die mit IFN (10 ng/ml) für 24 Stunden vorbehandelt und anschließend für die angegebene Dauer mit IFN (10 ng/ml) und TNF (5 ng/ml) behandelt wurden. C) Phosphorylierungsniveau von NF- κ B p65 nach der angegebenen IFN/TNF-Behandlungsdauer.

Neben diesen Beobachtungen konnte in DN PKN Zellen (- dox) im untersuchten Zeitraum ein konstant höheres Phosphorylierungsniveau für das NF- κ B p65-Molekül im Vergleich zu KA PKN Zellen (- dox) nach IFN/TNF-Gabe gezeigt werden (Abbildung 3-18A/B/C), was eine erhöhte NF- κ B-Aktivierung signalisiert (Sakurai *et al.*, 2003; Wajant und Scheurich, 2011). Abbildung 3-18C zeigt darüber hinaus den zeitlichen Verlauf der NF- κ B p65-Phosphorylierung. Nach einem initialen Anstieg (nach 10 Minuten) in beiden Gruppen nimmt das Phosphorylierungsniveau mit unterschiedlichen Kinetiken ab; DN PKN Zellen weisen für einen längeren Zeitraum eine vermehrte Phosphorylierung von NF- κ B p65 auf.

Der ebenfalls untersuchte NF- κ B-Inhibitor Ik-B α (Baeuerle und Baltimore, 1988) weist unter den beobachteten Bedingungen weder in DN, noch in KA PKN Zellklonen Differenzen zwischen induzierten und reprimierten Zellen hinsichtlich seines Phosphorylierungsmusters auf (Abbildung 3-18A/B).

Neben dem Phosphorylierungsniveau zentraler Proteine der MLCK- bzw. NF- κ B-Signalkaskaden wurden zusätzlich mögliche Variationen der Expression für das *tight junction* Adapterproteins ZO-1 und die MLC-Kinase untersucht (Abbildung 3-18A/B). Als Ladekontrolle für diese Untersuchungen diente das ubiquitär exprimierte GAPDH Protein. Es konnte dabei eine Verringerung der Expression von ZO-1 in DN PKN exprimierenden Zellen beobachtet werden, welche jedoch auch in Kontrollzellen zu detektieren war. Veränderungen dieser Art konnten weder in KA PKN Klonen, noch in den korrespondierenden Kontrollzellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte in KA PKN Zellen eine Abnahme der MLCK-Expression mit zunehmender IFN/TNF-Behandlungsdauer (vergleiche Zeitpunkt 0 h mit Zeitpunkt 4 h) gezeigt werden. Diese Abnahme war in DN PKN Zellen nicht zu sehen.

Es ließ sich demzufolge in DN PKN Zellen im Gegensatz zu KA PKN Zellen eine im Verlauf der Zeit zunehmende Verstärkung der MLC-Phosphorylierung und ein anhaltend höheres NF- κ B p65-Phosphorylierungsniveau nach kombinierter IFN/TNF-Behandlung zeigen. Zusätzlich zu diesen Änderungen bezüglich der Phosphorylierung konnte eine Abnahme der ZO-1 Gesamtproteinmenge im DN PKN Zellklon und eine Abnahme der MLCK-Expression im KA PKN Zellklon beobachtet werden.

3.12 MLCK-Inhibition mit Hilfe des Inhibitorpeptides PIK

Die durchgeführten und unter 3.18 dargestellten Western-Blot Analysen ließen eine Beteiligung des MLCK/MLC-Signalweges aufgrund der erhöhten Myosin Leichtketten

Phosphorylierung im DN PKN Zellklon vermuten. Zur Verifizierung dieser Annahme wurde das Peptid PIK, ein membran-permeierender Inhibitor der Myosin Leichtkettenkinase (Owens *et al.*, 2005; Zolotarevsky *et al.*, 2002), eingesetzt. Die zu untersuchenden Zellen wurden wiederum auf semipermeablen Filtern ausgesät, analog zu den vorherigen Experimenten behandelt und nach einer dreistündigen TNF Inkubationszeit wurde die Myosin Leichtkettenkinase durch die apikale Zugabe von PIK (250 μ M) inhibiert (Dosis und Zeitpunkt nach pers. Empfehlung von Prof. Dr. Jerrold R. Turner, University of Chicago).

In dominant negatives PKN exprimierenden Zellen konnte schon nach drei Stunden TNF-Behandlung eine signifikante Reduktion des epithelialen Widerstandes auf $92,2 \pm 2,7$ %, $p < 0,05$ des Kontrollzellwertes gemessen werden (Abbildung 3-19A). Diese TEW-Abnahme war bei gleichzeitigem Einsatz des MLCK-Inhibitors PIK nicht zu beobachten ($101,9 \pm 2,9$ % im Vergleich zur Kontrolle). Die Gabe von PIK ohne die DN PKN-Expression einzuschalten führte ebenfalls zu keiner Veränderung des TEW ($105,5 \pm 7$ % im Vergleich zur Kontrolle; Abbildung 3-19A). Abbildung 3-19B zeigt, dass in Zellen mit induzierter KA PKN-Expression nach dreistündiger TNF-Behandlung keine Veränderung des TEW zu messen war ($98,4 \pm 4$ % im Vergleich zur Kontrolle). Wurde zusätzlich PIK gegeben, konnte eine signifikante Erhöhung des TEW im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt werden (auf $109,2 \pm 1,9$ %, $p < 0,05$). In PIK-behandelten Kontrollzellen, in denen die KA PKN-Expression reprimiert war, konnte eine hochsignifikante Erhöhung des epithelialen Widerstandes gemessen werden (auf $122,1 \pm 4,7$ %, $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle).

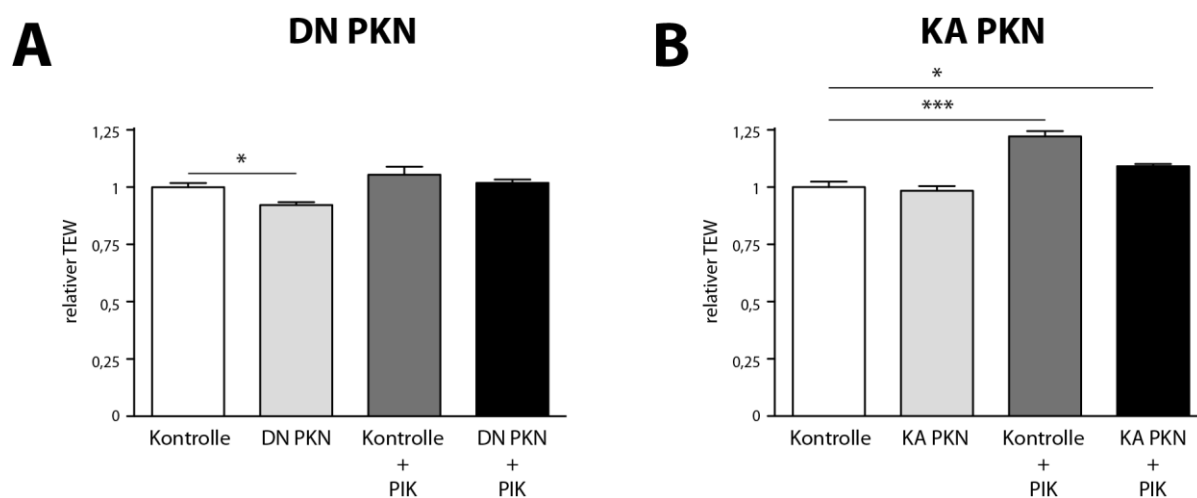


Abbildung 3-19 | MLCK-Inhibition mit Hilfe des Inhibitorpeptides PIK Dargestellt ist der relative TEW sowohl für Kontrollzellen als auch für A) DN und B) KA PKN exprimierende Zellen, die für 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) vorbehandelt und anschließend für weitere acht Stunden mit der Kombination IFN (10 ng/ml) und TNF (5 ng/ml) behandelt wurden (jeweils mit und ohne PIK (250 μ M); nach 3 h dazugegeben). (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; $n = 4$; Fehlerbalken stellen den Standardfehler des Mittelwerts dar)

Zusammenfassend dargestellt konnte mit Hilfe des MLCK-Inhibitorpeptides der verstärkte Abfall des transepithelialen elektrischen Widerstandes in TNF-behandelten dominant negativen PKN Zellen verhindert werden (siehe Abbildung 3-19A). Die Inhibition von MLCK verhinderte somit die Verstärkung der negativen Auswirkungen von TNF auf die Barrierefunktion in DN PKN Zellen. Zusätzlich konnte durch die zusätzliche Gabe von PIK in KA PKN Kontrollzellen (Kontrolle + PIK) und in KA PKN exprimierenden Zellen (KA PKN + PIK) eine signifikante Erhöhung des gemessenen Widerstandes gemessen werden (Abbildung 3-19B). Dies deutet darauf hin, dass passend zu den oben ausgeführten Beobachtungen die gesteigerte Phosphorylierung der MLC durch MLCK eine wesentliche Rolle für den beobachteten Effekt der verwendeten PKN-Mutanten hat.

3.13 Morphologie von KA und DN PKN Zellen nach IFN/TNF-Behandlung

Nachdem durch verschiedene funktionelle Untersuchungen in PKN-Mutanten exprimierenden Zellen ein Einfluss von PKN auf die Barrierefunktion nach TNF-Gabe beobachtet und die Myosin Leichtkettenkinase als möglicher Mediator identifiziert werden konnte, sollten mögliche Auswirkungen auf die strukturelle Integrität der *tight junctions* analysiert werden. In Zellen mit konstitutiv aktiver MLCK-Expression war bereits gezeigt worden, dass es zu wellenförmigen Verformungen der *tight junction* Areale kommt (Shen *et al.*, 2006).

Für die durchzuführenden morphologischen Untersuchungen wurde mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz das *tight junction* spezifische Adapterprotein ZO-1 angefärbt.

Analog zu den vorherigen Experimenten wurden Zellen auf Transwell® Filtern ausgesät und nach Abschluss der Differenzierung für 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) vor- und anschließend mit einer Kombination aus IFN (10 ng/ml) und TNF (5 ng/ml) für acht Stunden behandelt. Daran anschließend erfolgten die Fixierung der Zellen mit PFA und die Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung nach Protokoll.

Für alle untersuchten Gruppen konnte die ordnungsgemäße Lokalisation des ZO-1 Proteins innerhalb des *tight junction* Komplexes zwischen benachbarten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3-20). Zusätzlich zu diesen Beobachtungen wurden in DN PKN exprimierenden Zellen strukturelle Veränderungen der *tight junctions* nach TNF-Behandlung beobachtet. Die weißen Pfeile weisen auf abnormale Zellmembranmorphologien hin, welche ähnlich den in Abschnitt 3.1 beschriebenen Beobachtungen durch eine Vielzahl von Verformungen charakterisiert waren (Abbildung 3-20A; TNF – dox).

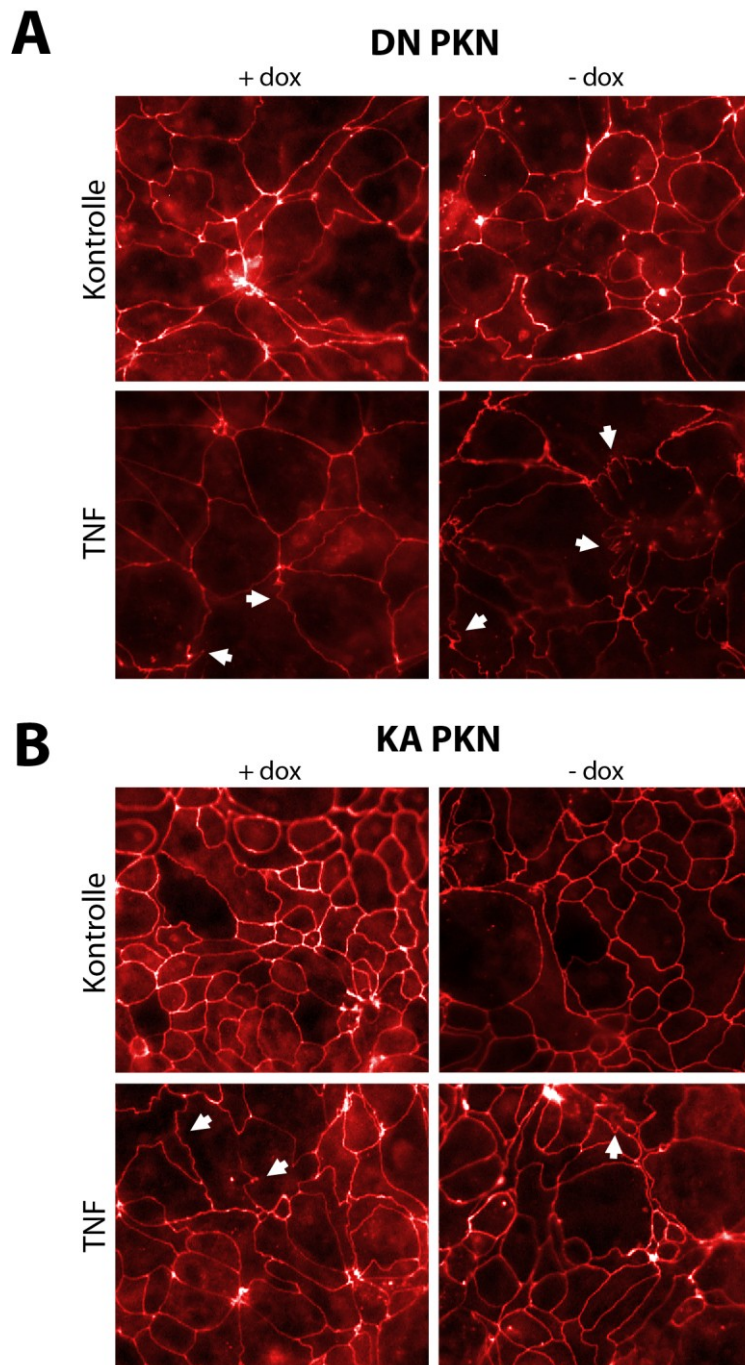


Abbildung 3-20 | Morphologie von DN und KA PKN Zellen nach IFN/TNF-Gabe Dargestellt ist die indirekte Immunfluoreszenz für das *tight junction* spezifische Adapterprotein ZO-1 in A) DN PKN Zellen und B) KA PKN Zellen nach 24-stündiger IFN (10 ng/ml) Vor- und 8-stündiger IFN (10 ng/ml) / TNF (5 ng/ml)-Behandlung im Vergleich zu Kontrollzellen. Die weißen Pfeile weisen auf Störungen der *tight junction* Architektur hin (400-fache Vergrößerung).

In TNF-behandelten Zellen in denen die DN PKN-Expression ausgeschaltet war (Abbildung 3-20A; TNF + dox), konnten ähnliche Membranverformungen beobachtet werden, wobei diese allerdings deutlich geringer ausgeprägt waren. Auch in KA PKN Kontrollzellen, welche

mit TNF behandelt wurden (Abbildung 3-20B; TNF + dox), waren ähnliche Phänomene zu detektieren. In gleichbehandelten KA PKN exprimierenden Zellen konnte, im Gegensatz zu DN PKN Zellen, keine weitere Verstärkung dieser Morphologieanomalien beobachtet werden (Abbildung 3-20B; TNF - dox).

Die Analyse der Zellmorphologie verdeutlichte somit, dass eine IFN/TNF-Behandlung bei gleichzeitiger Expression von DN PKN eine Aggravierung der strukturellen Veränderungen von *tight junctions* zur Folge hat, welche die Veränderungen des TEW (Abbildung 3-15) und des Phosphorylierungsniveaus von MLC (Abbildung 3-18) begleiten. In KA PKN exprimierenden Zellen konnte diese Verstärkung der TNF-Effekte nicht detektiert werden.

3.14 Längerfristige Auswirkungen der Expression von PKN-Mutanten auf die epitheliale Barriere nach IFN/TNF-Behandlung

Neben den Signalwegen, die akut die epitheliale Barrierefunktion regulieren, sollten in einem letzten Schritt mögliche längerfristige Veränderungen, welche die *pore pathway*-modulierte Permeabilität, die durch das spezifische Claudin-Expressionsmuster determiniert wird (Amasheh *et al.*, 2011; Shen *et al.*, 2011; Van Itallie und Anderson, 2006), betreffen, genauer untersucht werden. Hier konnte in zahlreichen Vorarbeiten gezeigt werden, dass insbesondere die Expression der Isoformen Claudin-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -12 und -15 einen wesentlichen Einfluss auf die parazelluläre Permeabilität epithelialer Zellverbindungen haben (Amasheh *et al.*, 2011), so dass die Expression dieser Proteine mittels Western-Blot untersucht wurde. Hierzu wurden sowohl Kontrollzellen (+ dox) als auch KA PKN und DN PKN exprimierende Zellen (- dox) nach Abschluss der Differenzierung für 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) vor- und anschließend für 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) und TNF (5 ng/ml) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe von RIPA-Puffer lysiert und ein Tricine-Western-Blot durchgeführt. Wie in Abbildung 3-21 gezeigt, fanden sich hierbei für die Claudine 1, 2, 3, 4, 5, 10, 12 und 15 keine Veränderungen zwischen induzierten und Kontrollzellen zum gewählten Zeitpunkt.

Abweichend von diesen Beobachtungen variierten die Proteine Claudin-7 und Claudin-8 in ihrem Expressionsniveau. Claudin-7 war dabei sogar gegensätzlich reguliert, in DN PKN Zellen reduzierte sich die Menge, in KA PKN Zellen nahm die Menge an Protein nach IFN/TNF-Behandlung zu. Für Claudin-8 konnte nur in DN PKN exprimierenden Zellen eine

Erhöhung der Proteinmenge nach 24-stündiger TNF-Behandlung gezeigt werden, KA PKN Zellen wiesen diese Veränderungen nicht auf.

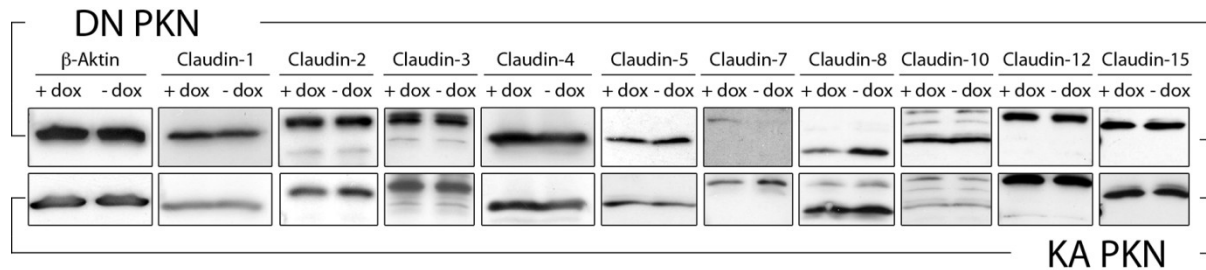


Abbildung 3-21 | Claudin-Expressionsmuster in DN und KA PKN Zellen nach IFN/TNF-Behandlung Dargestellt sind die Expressionsniveaus ausgewählter Claudinproteine sowohl für Kontrollzellen (+ dox) als auch für KA und DN PKN exprimierende Zellen (- dox), die mit IFN (10 ng/ml) für 24 Stunden vorbehandelt und anschließend für weitere 24 Stunden mit IFN (10 ng/ml) und TNF (5 ng/ml) behandelt wurden. Als Ladekontrolle diente das ubiquitär exprimierte β -Aktin.

Somit konnten neben den beobachteten kurzfristigen auch längerfristige Veränderungen, welche durch die Modulation der Claudinexpression nach einer 24-stündigen IFN/TNF-Behandlung in KA und DN PKN exprimierenden Zellen gekennzeichnet war, gezeigt werden.

4 Diskussion

Sowohl die Inzidenz als auch die Prävalenz von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) ist in den westlichen Industrienationen im Vergleich zu Entwicklungsländern erhöht (Loftus, 2004), wodurch allein in Deutschland pro Jahr 466 Millionen Euro an Kosten für das Gesundheitssystem entstehen (Prenzler *et al.*, 2011). Die Ätiologie dieser Erkrankungen ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht zur Gänze erforscht. Neben genetischen und Umweltfaktoren spielen die Fehlregulation des Immunsystems sowie Beeinträchtigungen der intestinalen Barrierefunktion wichtige Rollen bei der komplexen CED-Pathogenese (Baumgart und Carding, 2007; Podolsky, 2002; Schulzke *et al.*, 2009).

Auf molekularer Ebene konnte die kleine Rho-GTPase RhoA als eine Kandidaten-Komponente der pathogenetischen Mechanismen identifiziert werden, denn in entzündeter Darmmukosa von Morbus Crohn Patienten konnte eine erhöhte Aktivierung des RhoA/Rho-assoziierte Proteinase (ROCK)-Signalweges nachgewiesen werden (Segain *et al.*, 2003). Neben RhoA wurde auch die Myosin Leichtkettenkinase (MLCK) mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen in Verbindung gebracht, da deren Expression und Aktivität im Falle von Morbus Crohn ebenfalls erhöht ist (Blair *et al.*, 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche Beteiligung von RhoA und der RhoA Effektorkinase PKN an der TNF-induzierten Barrieredysfunktion in humanen intestinalen Epithelzellen zu untersuchen und so die Voraussetzungen dafür zu schaffen, in einem nächsten Schritt Ansatzpunkte für neue Therapien zu finden bzw. bereits etablierte Therapiestrategien zu komplementieren. Dafür wurden neben den für Inhibitorstudien verwendeten parental T84 Zellen induzierbare RhoA- und PKN-Expressionssysteme in Caco-2 Zellen etabliert.

4.1 Caco-2 und T84 Zellen als *in vitro* Modell der intestinalen Barriere

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei humane intestinale Epithelzelllinien, Caco-2 und T84, verwendet. Obwohl beide Zelllinien ihren Ursprung in einem kolorektalen Karzinom haben, stellen sie aufgrund der Tatsache, dass sie viele Merkmale der intestinalen Mukosa aufweisen, geeignete und häufig verwendete *in vitro* Modelle zur Untersuchung von Vorgängen im intestinalen Kontext dar. Zu diesen Merkmalen zählen unter anderem die

Ausbildung eines apikalen Bürstensaums sowie die Expression von Nährstofftransportern und Hydrolasen nach einer 14 – 21-tägigen Differenzierungsphase in Caco-2 Zellen (Chaturvedi *et al.*, 2011; Jumarie und Malo, 1991; Meunier *et al.*, 1995; Sambuy *et al.*, 2005). Diese Differenzierungsphase ist in T84 Zellen nicht notwendig; diese Zelllinie ähnelt bereits nach dem Erreichen der Konfluenz humanen Enterozyten (Dharmasathaphorn *et al.*, 1984).

Der Einsatz von Transwell® Filtern der Firma Corning stellt ein geeignetes und in der pharmakologischen Forschung umfassend eingesetztes Modellsystem für die Untersuchung von epithelialen Darmzellen dar, denn es ermöglicht Zellen unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen zu untersuchen (Meunier *et al.*, 1995). Die mit Hilfe dieses Ansatzes erfassten transepithelialen elektrischen Widerstände (TEW) stellen ein Maß für die Ionenpermeabilität der Zellmonolayer dar und bilden damit ein Surrogatparameter für die Integrität der Barriere (Blikslager *et al.*, 2007). Das T84 Zellsystem repräsentiert ein Modell mit hohen transepithelialen Widerständen (Barrett, 1993); Caco-2 Zellen weisen demgegenüber einen um den Faktor zehn verringerten Widerstand auf. Die Ursachen hierfür sind noch nicht vollständig aufgeklärt, eine mögliche Erklärung wären jedoch Variationen des Claudin-Expressionsmusters, welches auch im humanen intestinalen System für unterschiedliche Permeabilitäten der einzelnen Darmabschnitte verantwortlich ist (Amasheh *et al.*, 2011).

Mit der Erfassung des TEW kann nicht unterschieden werden, ob der Transport trans- oder parazellulär erfolgt. Man geht jedoch davon aus, dass der parazelluläre Transport für den Hauptteil des passiven Ionenflusses verantwortlich ist (Blikslager *et al.*, 2007), weshalb die Messung dieses Parameters häufig für die Bestimmung der Barrierefunktion genutzt wird. Eine Technik, die es ermöglicht, zwischen trans- und parazellulärem Transport zu differenzieren, stellt die *two path* Impedanzspektroskopie dar (Krug *et al.*, 2009), allerdings ist die Etablierung dieses Systems, sofern die notwendige Infrastruktur nicht bereits vorhanden ist, mit einem hohen Aufwand verbunden.

4.2 Validierung der TNF-induzierten Barrierestörung

Zahlreiche Vorarbeiten konnten eine Störung der epithelialen Barriere durch die proinflammatorischen Zytokine IFN und TNF demonstrieren, wobei einer Vielzahl von Zytokinkonzentrationen und Behandlungsdauern mit zum Teil diskrepanten Ergebnissen verwendet wurden.

So konnten in Caco-2 Zellen nach einer achttündigen kombinierten IFN (10 ng/ml) und TNF (2,5 bis 10 ng/ml) Behandlung eine Reduktion des TEW, eine Erhöhung der MLC-Phosphorylierung und schwerwiegende Alterationen der *tight junction* Architektur nachgewiesen werden (Wang *et al.*, 2005). In dieser Publikation war ebenfalls eine Vorbehandlung mit IFN notwendig. Abweichend von diesen Ergebnissen konnte die Arbeitsgruppe um Ma und Kollegen den TEW-Abfall und eine erhöhte Phosphorylierung der Myosin Leichtkette nach alleiniger TNF-Behandlung (10 ng/ml) zeigen (Ma *et al.*, 2005). Gründe für diese Diskrepanz könnte der längere Behandlungszeitraum von 24 Stunden oder die Caco-2 Zellkulturbedingungen sein, da sich abhängig von der Zelldichte bei Aussaat, der Differenzierung und der Zusammensetzung des Zellkulturmediums unterschiedliche zelluläre Reaktionen beobachten lassen (Sambuy *et al.*, 2005).

Erstes Ziel dieser Arbeit war daher, sowohl in Caco-2 als auch in T84 Zellen ein Protokoll zu etablieren, mit dem sich ein reproduzierbarer Barrierephänotyp beobachten ließ, um so die folgenden funktionellen Untersuchungen durchführen zu können. Hierfür wurde ein Ansatz gewählt, in dem die Zellen zuerst für 24 Stunden mit IFN präinkubiert und anschließend mit einer Kombination aus IFN und TNF behandelt wurden, da sich in verschiedenen Vorarbeiten eine Synergie beider Zytokine gezeigt hatte (Bruewer *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005) und auch *in vivo* beide Zytokine in erhöhter Konzentration vorliegen (Bruewer *et al.*, 2006; Reinecker *et al.*, 1993). Auf molekularer Ebene konnte darüber hinaus demonstriert werden, dass IFN zu einer Hochregulation der TNF-Rezeptoren führt und damit eine permissive Rolle für die TNF-Effekte einnimmt (Wang *et al.*, 2006).

Unter den gewählten Bedingungen konnten in Caco-2 (Abbildung 3-1) und T84 Zellen (Abbildung 3-10) eine Reduktion des TEW, Veränderungen der *tight junction* Struktur, die Internalisierung von Occludin sowie ein erhöhtes MLC-Phosphorylierungsniveau nachgewiesen werden. Die erhobenen Daten entsprechen qualitativ und quantitativ den von anderen Arbeitsgruppen berichteten Ergebnissen (Bruewer *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2005; Marchiando *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2006). Obwohl sich eine Verstärkung des Effekts mit höheren Dosen und längerer Inkubationsdauer zeigte (Abbildung 3-1D), wurden bewusst relativ niedrige Konzentrationen ausgewählt, um eine Interferenz mit den bekannten zytotoxischen Effekten (Gitter *et al.*, 2000; Zeissig *et al.*, 2004) dieser Substanzen in höheren Konzentrationen zu vermeiden. Trotz der Tatsache, dass es sich hier zunächst primär um eine Reproduktion bereits veröffentlichter Daten handelt, war die Durchführung dieser Experimente für die vorliegende Arbeit von entscheidender Wichtigkeit, da sie die Grundlage für die folgenden Experimente bildeten.

Darüber hinaus wurde mit Adalimumab eine auch klinisch eingesetzte Substanz verwendet, um die TNF-Abhängigkeit der beobachteten Effekte mit einer zusätzlichen und so noch nicht publizierten Methodik zu untersuchen. Adalimumab ist der erste vollständig humane monoklonale TNF-Antikörper, der zur Behandlung von rheumatoider und psoriatischer Arthritis sowie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen eingesetzt wird (Van Assche *et al.*, 2007). Es bindet spezifisch an lösliches TNF, verhindert die Interaktion mit den TNF-Rezeptoren und damit die Aktivierung von inflammatorischen Signalkaskaden (Weinberg und Buchholz, 2006).

Es zeigte sich bei der Verwendung dieses Antikörpers eine komplette Antagonisierbarkeit aller Endpunkte in Caco-2 und T84 Zellen, was erneut die entscheidende Bedeutung von TNF unterstreicht.

4.3 Das induzierbare Tet-Off Expressionssystem

Die kleine Rho-GTPase RhoA ist ein zentrales Signalmolekül, welches an der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie zum Beispiel der Organisation des Aktin-Zytoskeletts, der Genexpression, der Zellproliferation und -migration beteiligt ist (Jaffe und Hall, 2005).

Neben diesen Eigenschaften lieferten mehrere Arbeiten Hinweise auf eine Beteiligung Rho-abhängiger Signalprozesse an der Regulation der *tight junction* Permeabilität, wobei insbesondere für den RhoA Effektor ROCK gezeigt werden konnte, dass er das Phosphorylierungsniveau der Myosin Leichtkette direkt oder über weitere Effektoren erhöhen kann (Amano *et al.*, 1996; Chaturvedi *et al.*, 2011; Kimura *et al.*, 1996; Schwartz, 2004).

Aufgrund dieser Beobachtungen und der Tatsache, dass die Aktivität des RhoA/ROCK-Signalweges im entzündeten Darmepithel von Morbus Crohn Patienten erhöht ist (Segain *et al.*, 2003), wurde ein Tet-Off induzierbares Expressionssystem etabliert mit Hilfe dessen die Auswirkungen der Expression einer konstitutiv aktiven (KA) RhoA Mutante (G14V) auf die parazelluläre Permeabilität untersucht werden sollten. Bei dieser Mutante resultiert der Aminosäureaustausch von Glycin in Position 14 mit Valin in einer niedrigeren GTP-Hydrolyserate, welche eine konstitutive Aktivierung zur Folge hat (Garrett *et al.*, 1989).

Für die Etablierung eines induzierbaren RhoAG14V-Expressionssystems wurden Caco-2 Zellen verwendet, da diese Zellen im Gegensatz zu T84 Zellen gut stabil transfizierbar sind

(pers. Mitteilung unseres Kooperationspartners Prof. Dr. Jerrold R. Turner, University of Chicago) und bereits erfolgreich mit dem Regulatorprotein tTA (Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator) in Vorarbeiten transfiziert und publiziert wurden (Shen *et al.*, 2006). Ein Vorteil eines induzierbaren Expressionssystems ist die Möglichkeit einer direkten Kontrolle unter Umgehung des Einsatzes von Leervektorklonen, wodurch eventuelle Integrationseffekte bei Kontrollklonen ausgeschlossen werden können. Somit sind die beobachteten Effekte nach Überexpression auf das jeweilige Zielgen zurückzuführen. Zusätzlich kann die Expression potenziell zytotoxischer oder den Differenzierungsprozess beeinflussender Proteine durch die Gabe von Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin verhindert bzw. limitiert werden. Der Einsatz eines induzierbaren Systems ermöglicht zusätzlich die Umgehung der Limitierung, dass die Caco-2 Zelllinie nicht homogen ist, sondern Eigenschaften einer polyklonalen Zellpopulation aufweist (Sambuy *et al.*, 2005; Volpe, 2008; Yu *et al.*, 1997). Mit einem induzierbaren System werden demzufolge nur gleiche Zellpopulationen untersucht.

Eine Repression der Expression unterhalb des Detektionslimits des Western-Blot Systems konnte schon bei Doxyzyklinkonzentrationen von 1 ng/ml gezeigt werden (Abbildung 3-4B). Um eine zuverlässige Abschaltung der Zielgenexpression auch nach mehrtägiger Kultivierung zu gewährleisten, wurde eine Doxyzyklinkonzentration von 100 ng/ml im Zellkulturmedium gewählt. Hinweise auf zytotoxische Effekte bei der Verwendung dieser Dosen ergaben sich im Rahmen dieser Arbeit nicht und waren aufgrund der geringen Toxizität (Riond und Riviere, 1988) nicht zu erwarten. Bei der Analyse von verschiedenen FBS-Chargen waren erhebliche Unterschiede bzgl. der maximalen RhoA-Expressionsinduktion zu sehen (Abbildung 3-4A). Dies ist vermutlich auf Verunreinigungen des verwendeten Serums mit Tetrazyklin oder seinen Derivaten zurückzuführen (Baron und Bujard, 2000).

Immunfluoreszenzanalysen vor und nach Induktion ergaben, dass nicht alle selektierten Zellen RhoA exprimieren (Abbildung 3-4E). Dies könnte möglicherweise auf eine nicht monoklonale Population hinweisen, bei der zusätzlich zu RhoA und Puromycin-Resistenzgen transfizierten Zellen auch Zellen, die nur mit dem Puromycin-Resistenzgen transfiziert wurden, selektiert wurden. Eine weitere mögliche Erklärung könnte eine im Laufe der Kultivierung in einigen Zellen auftretende Methylierung des CMV Promotors darstellen (Brooks *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2010), welche zur Inaktivierung der RhoA-Expression führen würde. Passend hierzu zeigte sich eine Verschlechterung der Induktionseigenschaften (z.B. die Höhe der Maximaexpression nach Induktion) nach mehrfacher Subkultivierung der Zellen (Daten nicht gezeigt).

Eine Funktionalität des exprimierten konstitutiv aktiven RhoA konnte mit Hilfe eines RhoA-Aktivierungsassays gezeigt werden (Abbildung 3-5). Nach Doxyzyklin-Entzug war eine Erhöhung von gebundenem aktiven RhoA zu detektieren, was eine Aktivierung von RhoA-abhängigen Signaltransduktionswegen signalisiert (Cytoskeleton, 2011).

Da RhoA wie einleitend beschrieben eine zentrale Rolle bei der Koordinierung einer Vielzahl zellulärer Prozesse spielt, sollte in einem nächsten Schritt überprüft werden, ob die Expression von konstitutiv aktivem RhoA mit der Differenzierung von Caco-2 Zellen interferiert. Hierfür wurde als Surrogatparameter die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) gewählt, welche die Abschätzung des Differenzierungsgrades in diesem System ermöglicht. Im Zuge der etwa dreiwöchigen Differenzierungsphase von Caco-2 Zellen kommt es zu einer vermehrten Expression und daraus resultierend zu einer erhöhten Aktivität (Matsumoto *et al.*, 1990; Sambuy *et al.*, 2005), was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte (Abbildung 3-6). Hierbei konnte kein Einfluss von Doxyzyklin-supplementiertem Medium auf die Kinetik der AP-Induktion gefunden werden. Auch nach Expression von konstitutiv aktivem RhoA fand sich zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine signifikante Änderung in der Aktivität dieses Enzyms. Somit ergab die Analyse dieses Parameters keine Hinweise auf eine gravierende Störung der Zelldifferenzierung durch die Aktivierung von RhoA. Auch die lichtmikroskopische Analyse der Zellmorphologie zeigte in KA RhoA exprimierenden Zellen keine Auffälligkeiten (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund dieser Beobachtungen war eine Verwendbarkeit des induzierbaren Systems für die weiteren Untersuchungen gegeben.

4.4 Effekte der RhoA-Aktivierung auf die epitheliale Barriere

Untersuchungen in verschiedenen *in vitro* Modellsystemen lieferten Hinweise auf eine Schlüsselrolle von RhoA bei der Regulation der Barrierefunktion. So resultierte sowohl die Gabe des RhoA-aktivierenden zytotoxisch-nekrotisierenden Faktors (CNF-1) als auch die von inaktivierenden Toxinen aus *Clostridium botulinum* (Nusrat *et al.*, 1995) bzw. *Clostridium difficile* (Gerhard *et al.*, 1998) in einem Abfall des TEW in Caco-2 Zellen, welcher bei der Verwendung von CNF-1 mit der Ausbildung von Aktin-Stressfasern assoziiert war. Diese RhoA-verursachten Störungen konnten auch in epithelialen T84 Zellen, welche mit CNF-1 behandelt wurden, nachgewiesen werden (Hopkins *et al.*, 2003). Bestätigungen dieser Ergebnisse lieferten Untersuchungen, welche mit Hilfe eines induzierbaren

Expressionssystemen in MDCK Epithelzellen die Funktion von RhoA bei der Regulation der *tight junction* Funktion genauer charakterisierten. In diesem alternativen Ansatz führte die Expression dominant negativer und konstitutiv aktiver RhoA-Mutanten ebenfalls zu einer Verminderung des epithelialen Widerstandes (Bruewer *et al.*, 2004; Jou *et al.*, 1998). Auch zur Ausbildung von Aktin-Stressfasern kam es in diesem *in vitro* Modell nur bei Expression der konstitutiv aktiven RhoA-Variante (Jou *et al.*, 1998). Eine RhoA-vermittelte Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts, welche eine Regulation der *tight junction* Funktion zur Folge hat, wurde als mögliche Erklärung dieser Beobachtungen vorgeschlagen (Jou *et al.*, 1998).

Die molekularen Mechanismen, über die RhoA die Barrierefunktion moduliert, sind noch nicht vollständig aufgeklärt, man geht jedoch davon aus, dass ein Teil der Effekte über die RhoA/ROCK-Achse vermittelt wird (Walsh *et al.*, 2001) und dass ein präzise reguliertes Gleichgewicht zwischen aktiviertem und inaktiviertem RhoA für die Formierung und Aufrechterhaltung der *tight junction* Funktion essenziell ist (Matter und Balda, 2003).

In Abschnitt 3.2.6 sind die Auswirkungen der Expression einer konstitutiv aktiven RhoA-Mutante auf den epithelialen Widerstand von Caco-2 Zellen dargestellt. Eine kontinuierliche Expression von konstitutiv aktivem RhoA führte zu keiner signifikanten Veränderung des TEW nach Abschluss der 21-tägigen Differenzierungsphase (Abbildung 3-7A). Auch die Expression des Differenzierungsmarkers AP (Abbildung 3-6) zeigte unter diesen Bedingungen keine Veränderungen. Während diese Beobachtungen subtilere Alterationen im gewählten Zellsystem nicht ausschließen können, erscheint das Fehlen eines RhoA-Effektes auf relativ komplexe globale Differenzierungsindikatoren wie den TEW und die AP-Aktivität in Anbetracht der wesentlichen Rolle, die RhoA-abhängige Signalwege für eine Vielzahl biologischer Prozesse spielen, zunächst unerwartet und könnte auf zelluläre Kompensationsmechanismen hinweisen, die eine längerfristige Dysregulation dieser zentralen Signalwege verhindern. Dies wird weiterhin durch die Ergebnisse unterstützt, die in Zellen erhalten wurden, in denen die Expression der konstitutiv aktiven RhoA-Mutante erst nach Abschluss der Differenzierung aktiviert wurde. Hier fand sich übereinstimmend mit den Beobachtungen von Jou *et al.* und Bruewer *et al.* (Bruewer *et al.*, 2004; Jou *et al.*, 1998) ein signifikanter Abfall des Barrierewiderstandes, der im weiteren Zeitverlauf vollständig regredient war (Abbildung 3-7B). Im Gegensatz zur direkten Verschlechterung der Barrierefunktion nach Gabe RhoA-aktivierender Moleküle (Gerhard *et al.*, 1998; Nusrat *et al.*, 1995) zeigte sich eine veränderte Kinetik des TEW-Abfall, denn dieser konnte erst mit einer Verzögerung von etwa 96 Stunden gemessen werden. Diese Zeitspanne entspricht

jedoch in etwa der ebenfalls mit einem induzierbaren System in MDCK Zellen ermittelten für eine Reduktion des Widerstandes erforderlichen Zeit (Jou *et al.*, 1998).

ROCK ist direkt und indirekt in die Regulation des Myosin Leichtketten-Phosphorylierungsniveaus involviert, da sie sowohl die Funktion der Myosinphosphatase inhibieren (Kimura *et al.*, 1996) als auch MLC direkt phosphorylieren kann (Amano *et al.*, 1996). Zusätzlich konnte in verschiedenen experimentellen Systemen eine Aktivierung der MLC-Kinase durch RhoA/ROCK gezeigt werden, die zu einem erhöhten MLC-Phosphorylierungsniveau und konsekutiv zu einem reduzierten Barrierewiderstand führte (Terry *et al.*, 2010; Totsukawa *et al.*, 2000; Vandenbroucke *et al.*, 2008). Diese Veröffentlichungen sowie die in dieser Arbeit gezeigte Korrelation der KA RhoA- und MLCK/phospho-MLC-Mengen legen den Schluss nahe, dass die im Western-Blot gezeigte Erhöhung des MLC-Phosphorylierungsgrades nach Aktivierung der KA RhoA-Expression über ROCK und MLCK vermittelt wird (Abbildung 3-8A). Die in dieser und in der Arbeit von Jou und Kollegen (Jou *et al.*, 1998) beobachtete Verzögerung der negativen Auswirkungen auf die Barrierefunktion nach Induktion könnte im langsam steigenden KA RhoA-Expressionsniveau begründet sein. Möglicherweise muss ein physiologischer Grenzwert an aktivierten RhoA-Molekülen überschritten werden, damit es zu detektierbaren Veränderungen der *tight junction* Funktion kommt. Diese Vermutung wird durch Immunfluoreszenzanalysen unterstützt, denn nur in Zellen mit hoher KA RhoA-Expression konnte eine Erhöhung des MLC-Phosphorylierungsniveaus sowie das vermehrte Auftreten von Aktin-Stressfasern gezeigt werden (Abbildung 3-8B/C).

Aufgrund der beobachteten Ergebnisse wurde eine Verbindung zwischen der TNF- und RhoA-induzierten Barrierestörung, welche beide mit einer Erhöhung der MLC-Phosphorylierung assoziiert waren, vermutet. Um diese mögliche Verbindung genauer zu charakterisieren, wurden konstitutiv aktives RhoA exprimierende Zellen zusätzlich mit IFN und TNF behandelt. Es zeigte sich jedoch ein unerwartetes Ergebnis, denn weder additive noch synergistische Effekte bezüglich einer Verschlechterung der Barrierefunktion nach dieser Simultanbehandlung konnten gemessen werden (Abbildung 3-9). Die Expression von konstitutiv aktivem RhoA hat nach kombinierter IFN/TNF-Behandlung eher einen protektiven denn schädigenden Einfluss auf die *tight junction* Funktion.

Angesichts der protektiven Funktion von konstitutiv aktivem RhoA wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Aktivierung eines alternativen RhoA-Effektorsignalweges ursächlich hierfür verantwortlich ist.

4.5 Aktivierung des RhoA Effektors PKN nach kombinierter IFN- und TNF-Behandlung

Die RhoA Effektor Serin/Threonin Proteinkinase 1 (PKN) stellte ein potenziell geeignetes Molekül für die Vermittlung der beobachteten protektiven Funktion dar, denn es konnte sowohl als Regulator der Barrierefunktion als auch von zwei zentralen inflammatorischen Signalwegen (NF- κ B und JNK), welche nach der Stimulation mit TNF aktiviert werden, identifiziert werden. So konnte in unserer Arbeitsgruppe eine Interferenz von PKN mit der tight junction Versiegelung im Mammaepithel während der Trächtigkeit nachgewiesen werden, die sich auch in einem *in vitro* System reproduzieren ließ (Fischer *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurde in mehreren Arbeiten auch eine Beteiligung von PKN an der Regulation des TNF-Signalweges demonstriert. Der TNF-Rezeptor-assoziierte Faktor 1 (TRAF1) konnte *in vivo* und *in vitro* als Substrat von PKN identifiziert werden, dessen Phosphorylierung die Interaktion mit dem TNF-Rezeptor 2 ermöglicht und damit eine Abschwächung der konstitutiven NF- κ B- und JNK-Signalkaskadenaktivität bewirken kann (Kato *et al.*, 2008). Neben TRAF1 ist PKN auch in der Lage mit TRAF2 zu interagieren, wodurch das Verhältnis dieser beiden Moleküle verändert und in der Konsequenz die Aktivität dieser inflammatorischen Signalwege moduliert werden kann (Gotoh *et al.*, 2004; Kato *et al.*, 2008).

Eine weitere Arbeit lieferte zusätzliche Hinweise darauf, dass PKN in die Modulation des NF- κ B-Signalweges involviert ist, denn unter anderem konnte in PKN siRNA-knockdown Zellen nach TNF-Stimulation eine erhöhte NF- κ B-abhängige Reporterexpression nachgewiesen werden (Haraga und Miller, 2006). Haraga und Miller schlagen dem entsprechend ein Modell vor, bei dem es zu einer PKN-Phosphorylierung im Zuge einer *Salmonella enterica* Infektion kommt, wodurch die NF- κ B-Aktivität verringert und damit eine inflammatorische Reaktion des betreffenden Organismus verhindert bzw. abgeschwächt wird.

Konsistent mit dieser vermuteten Funktion von PKN in der Transduktion TNF-vermittelter Signale konnte in dieser Arbeit erstmals eine direkte Aktivierung von PKN nach TNF-Stimulation in T84 Zellen gezeigt werden, denn sechs Stunden nach TNF-Applikation war eine deutliche Erhöhung des Phosphorylierungsniveaus zu detektieren (Abbildung 3-10C), welches einen Indikator für die PKN-Aktivierung darstellt (Dong *et al.*, 2000; Flynn *et al.*, 2000). Die TNF-Spezifität dieser PKN-Aktivierung konnte auch in diesem Experiment durch den Einsatz des TNF-Antikörpers Adalimumab verifiziert werden.

4.6 TEW nach Inhibition von PKN und kombinierter IFN- und TNF-Behandlung

Um die funktionelle Relevanz der beobachteten PKN-Aktivierung durch TNF zu testen, erfolgte in einem ersten Schritt die Inhibierung dieser Kinase durch die chemischen Inhibitoren Bisindolylmaleimid I und Ro 31-8220.

Hier zeigte sich für beide Substanzen eine Verschlechterung der Barrierefunktion nach kombinierter IFN- und TNF-Behandlung (Abbildung 3-11), was einen Hinweis auf eine möglicherweise protektive Funktion von aktiviertem PKN darstellte. Darüber hinaus fand sich auch in den nur mit IFN- und Inhibitor-behandelten Gruppen ein hochsignifikanter TEW-Abfall (Abbildung 3-11). Viabilitätsuntersuchungen ergaben nach Gabe von Bisindolylmaleimid I eine verringerte Anzahl an lebensfähigen Zellen, was einen Grund für den verringerten epithelialen Widerstand darstellen könnte (Abbildung 3-11C). Dies war beim Einsatz von Ro 31-8220 nicht zu beobachten, weshalb vermutlich die Regulation Barriere-modulierender Signalwege ursächlich ist. Hierbei ist zu beachten, dass sowohl Bisindolylmaleimid I als auch Ro 31-8220 neben PKN auch verschiedene Isoformen der strukturverwandten PKC mit höherer Affinität inhibieren (Jacobson *et al.*, 1995; Wilkinson *et al.*, 1993), so dass die mit diesen Verbindungen erhobenen Daten nur begrenzte Schlussfolgerungen in Bezug auf die funktionelle Bedeutung von PKN gestatten. Auf der anderen Seite konnten mehrere Arbeiten zeigen, dass nicht die Inhibition, sondern die Aktivierung von PKC zu Beeinträchtigungen der *tight junction* Funktion führt (Clark *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2009). Infolgedessen scheint eine Rolle von PKN bei der Vermittlung der Barriestörungen möglich, denn dessen Inhibition könnte zu einer Verstärkung der konstitutiven TNF-Rezeptor 2 Aktivierung und der daraus folgenden Aktivierung der NF- κ B- und JNK-Signalkaskaden (Kato *et al.*, 2008) führen.

Um die Limitationen der unspezifischen chemischen Kinaseinhibitoren zu umgehen, wurde in einem nächsten Schritt ein spezifisches PKN-Inhibitorpeptid (PRL; IC₅₀ 0,7 μ M), welches nur PKN, aber nicht die strukturverwandte PKC inhibiert (Shiga *et al.*, 2010), eingesetzt. Hier konnten die zuvor erhobenen Daten bestätigt werden, denn auch in diesem Ansatz war die Blockade der PKN-Funktion bei gleichzeitiger IFN- und TNF-Behandlung mit einer weiteren Verschlechterung der Barrierefunktion assoziiert (Abbildung 3-12).

Zusammenfassend wiesen diese Inhibitorstudien damit auf eine mögliche barriereprotektive Rolle der Aktivierung von PKN durch TNF hin, die im weiteren mit Hilfe des erneuten

Einsatzes eines induzierbaren Expressionssystems durch einen unabhängigen experimentellen Ansatz untersucht werden sollte.

4.7 Effekte der induzierbaren Expression einer konstitutiv aktiven oder dominant negativen PKN-Mutante auf die epitheliale Barrierefunktion

Analog zur Etablierung der KA-RhoA-pBI-L-Konstrukte wurden induzierbare dominant negative (DN) und konstitutiv aktive (KA) PKN-Konstrukte generiert.

Übereinstimmend mit vorherigen in unserem Labor durchgeführten Arbeiten war ein direkter PKN-Nachweis auf Proteinebene durch den FLAG-Antikörper aufgrund der limitierten Spezifität dieses Antikörpers nicht möglich, jedoch konnte mit Hilfe eines Immunpräzipitation-Ansatzes der Expressionsnachweis geführt werden (Abbildung 3-13).

Unter Verwendung des induzierbaren Expressionssystems konnten die Ergebnisse der Inhibitorstudien bestätigt werden. Das Ausschalten der PKN-Funktion durch die Expression einer dominant negativen Variante resultierte in einer weiteren signifikanten Verschlechterung des gemessenen epithelialen Widerstandes gegenüber TNF-behandelten Kontrollzellen, in denen die DN PKN-Expression ausgeschaltet war (Abbildung 3-15). Dieses Resultat sowie die Verbesserung der Barrierefunktion nach einer 24-stündigen TNF-Behandlung bei gleichzeitiger Expression der konstitutiv aktiven PKN-Mutante legen eine protektive Funktion von PKN bei der TNF-induzierten Barrierestörung nahe.

4.7.1 Transepitheliale elektrische Widerstände nach Inhibition von PKN mittels Ro 31-8220 und gleichzeitiger Expression von DN oder KA PKN

Sowohl die mit Hilfe des PKN/PKC-Inhibitors Ro 31-8220 als auch die unter Verwendung des dominant negativen PKN-Konstruktes erhobenen Daten deuteten auf die Verstärkung der negativen Auswirkungen einer TNF-Gabe nach Hemmung von PKN hin. Um zu untersuchen, inwieweit die unter Verwendung des unspezifischen Kinaseinhibitors erhobenen Daten tatsächlich einen Effekt von PKN und nicht den einer anderen strukturverwandten Kinase wie denen der PKC-Familie widerspiegeln, wurden KA und DN PKN exprimierende Zellen mit Ro 31-8220 und TNF behandelt (Abbildung 3-16). Dabei wurde beobachtet, dass der durch Ro 31-8220-induzierte TEW-Abfall nach TNF-Behandlung durch die Aktivierung von PKN

antagonisiert werden konnte. Es zeigt sich jedoch in diesen Experimenten auch in KA PKN Zellen, die in der Gegenwart von Doxyzyklin mit TNF behandelt wurden (und somit der Kontrollgruppe entsprechen sollten) ein Ausbleiben des TEW-Abfalls sowie ein verringerter TEW-Abfall nach Gabe von Ro 31-8220 (Abbildung 3-16). Dies ist möglicherweise Folge einer intrinsischen Restaktivität des CMV-Minimalpromotors (Shaikh und Nicholson, 2006), die auch im doxyzyklinhaltigen Wachstumsmedium eine minimale Expression von konstitutiv aktivem PKN vermittelt und damit die erhaltenen Ergebnisse erklären könnte.

Die Beobachtung einer Antagonisierbarkeit des Ro 31-8220-Effektes durch Expression der konstitutiv aktiven PKN-Mutante wird durch das Fehlen synergistischer Effekte hinsichtlich einer Beeinträchtigung der Barrierefunktion nach kombinierter Expression von DN PKN und Ro 31-8220-Gabe in TNF-behandelten Zellen komplementiert, so dass diese Daten zusammenfassend auf die Vermittlung der beobachteten Effekte durch einen gemeinsamen Signalweg hindeuten.

4.7.2 Charakterisierung der Ionenpermeabilität und der beteiligten Signaltransduktionswege in DN und KA PKN exprimierenden Zellen nach IFN- und TNF-Behandlung

Wie in der Einleitung beschrieben ist die TNF-induzierte Barriestörung durch eine größenunabhängige Erhöhung der parazellulären Permeabilitäten gekennzeichnet, welche durch Aktivierung der Myosin Leichtkettenkinase und die damit verbundene Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts vermittelt wird (Shen *et al.*, 2011; Weber *et al.*, 2010). Neben TNF konnte auch IFN als Induktor einer erhöhten Permeabilität von größeren Molekülen identifiziert werden (Watson *et al.*, 2005). In Anlehnung an das einleitend vorgestellte Konzept, welches zwischen Barriestörungen vom *pore*- und *leak*-Typ unterscheidet, sollte ausgehend von den in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten Beobachtungen der durch PKN-modulierte Barriere Defekt über die erhobenen TEW-Daten hinaus näher charakterisiert werden. Hierbei erfolgte mit Hilfe modifizierter elektrophysiologischer Methoden die Analyse der Permeabilität von Ionen verschiedener Größe, um diesen Defekt als *pore* oder *leak pathway* vermittelte Störung zu klassifizieren.

Wie in Abbildung 3-17A dargestellt, konnte in TNF-behandelten Kontrollzellen (KA PKN + dox) eine Erhöhung der Permeabilitäten für Moleküle aller untersuchten Größen festgestellt werden, wobei nur für TEA (6,58 Å) und NMDG (7,29 Å) das Signifikanzniveau erreicht wurde. Mögliche Ursachen für diese Beobachtungen könnte eine basale Restexpression von

konstitutiv aktivem PKN sein, oder die Tatsache, dass der transepitheliale Flux von größeren Substanzen durch IFN erhöht sein kann, ohne die *pore pathway* vermittelte Permeabilität zu beeinflussen (Watson *et al.*, 2005). Die Beobachtungen, dass nach Expression der konstitutiv aktiven PKN-Mutante diese Erhöhung nivelliert wurde (Abbildung 3-17C) und im Gegensatz dazu die Expression von dominant negativem PKN eine weitere, für die *leak pathway*-beeinflussten Größen, signifikante Erhöhung der Permeabilitäten gezeigt werden konnte (Abbildung 3-17E), spricht für eine protektive Rolle von PKN bei der TNF-induzierten Barrieredysfunktion. Des Weiteren legen sie nahe, dass diese Effekte über die MLCK/MLC-Signalkaskade vermittelt werden bzw. als *leak pathway*-vermittelte Störung klassifiziert werden können, welche durch eine größenunabhängige Erhöhung der Permeabilität von Substanzen charakterisiert ist (Shen *et al.*, 2011).

Dies wurde auf molekularer Ebene durch die Beobachtung bestätigt, dass sich in dominant negatives PKN exprimierenden Zellen gegenüber Kontrollzellen bereits nach einer zwei- und vierstündigen TNF-Behandlung eine verstärkte MLC-Phosphorylierung zeigte (Abbildung 3-18A). In Zellen, welche eine konstitutiv aktive PKN-Mutante exprimierten, konnte hingegen zu keinem der untersuchten Zeitpunkte eine Erhöhung des MLC-Phosphorylierungsniveaus festgestellt werden (Abbildung 3-18B). Demzufolge ist die Verbesserung des TEW (Abbildung 3-15C) und die Prävention eines Ionenpermeabilitätsanstieges (Abbildung 3-17C) im Vergleich zu Kontrollzellen vermutlich eine Folge der Verhinderung einer erhöhten Myosin Leichtketten-Phosphorylierung.

Neben der gut charakterisierten MLCK/MLC-Achse (Ma *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005) konnte auch für NF- κ B eine Beteiligung an der Regulation der epithelialen Barrierefunktion nach TNF-Gabe gezeigt werden, wobei die genaue Rolle dieses Transkriptionsfaktors noch unklar ist, da sowohl Hinweise für einen protektiven als auch für einen schädigenden Einfluss auf die epitheliale Barriere existieren. So demonstrierten Wang *et al.* eine stärkere Ausprägung des TNF-induzierten Phänotyps nach Inhibition (u.a. mit MG 132; Triptolide) von NF- κ B (Wang *et al.*, 2005). In einer weiteren Arbeit konnte die Notwendigkeit einer NF- κ B-Aktivierung für die Wiederherstellung der Barrierefunktion nach der TNF-induzierten Apoptose nachgewiesen werden (Soler *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu steht die Beobachtung, dass die Translokation von NF- κ B p65 in den Zellkern, die Verringerung der ZO-1 Expression und die Abnahme des transepithelialen Widerstandes nach TNF-Behandlung durch den Einsatz des NF- κ B-Inhibitors Curcumin aufgehoben werden konnte (Ma *et al.*, 2004). Zusätzliche Untersuchungen ergaben, dass der Einsatz von geringen Dosen (0,5 mM) des NF- κ B-Inhibitors SSA eine IFN/TNF-induzierte Barriestörung verhindern kann (Wang

et al., 2005). Diese Beobachtungen sind nicht nur auf Epithelzellen beschränkt, denn auch in Endothelzellen konnte eine RhoA- und NF- κ B-vermittelte Erhöhung der Permeabilität (He *et al.*, 2011) sowie ein erhöhtes MLC-Phosphorylierungsniveau (Wu *et al.*, 2009) als Reaktion auf inflammatorische Stimuli demonstriert werden. Auch Tang und Kollegen konnten eine Internalisierung von *tight junction* Proteinen und eine erhöhte parazelluläre Permeabilität nach Aktivierung von NF- κ B nachweisen (Tang *et al.*, 2010). Eine mögliche Erklärung für die diskrepanten Ergebnisse zur Rolle von NF- κ B bei der TNF-induzierten Barrieredysfunktion könnte die Verwendung verschiedener experimenteller Systeme sowie die Komplexität dieses zentralen Signalweges darstellen.

In dieser Arbeit konnte eine Korrelation der erhöhten NF- κ B p65-Aktivität mit der TNF-vermittelten Barrierestörung demonstriert werden (Abbildung 3-18A/B/C). Die Beobachtungen sprechen dabei eher für einen Barriere-schädigenden Einfluss von NF- κ B, denn es konnte in DN PKN Zellen sowohl ein erhöhter Phosphorylierungsgrad gegenüber Kontrollzellen (Abbildung 3-18A) als auch eine über einen längeren Zeitraum erhöhte Aktivierung gegenüber gleichbehandelten konstitutiv aktives PKN exprimierenden Zellen gezeigt werden (Abbildung 3-18C).

Zusätzlich zu diesen Ergebnissen konnte in TNF-behandelten Kontroll- und DN PKN Zellen (+ dox / - dox) auch eine Abnahme der ZO-1 Expression im Verlauf der Zeit detektiert werden (Abbildung 3-18A). Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Ma und Kollegen, die dies in Caco-2 Zellen zeigen und durch den Einsatz von NF- κ B-Inhibitoren verhindern konnten (Ma *et al.*, 2004). Im KA PKN Zellklon konnte diese Veränderungen nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3-18B). Neben diesen Ergebnissen lieferten auch die Immunfluoreszenzanalysen von ZO-1 zusätzliche Hinweise auf eine protektive Rolle von PKN bei der TNF-induzierten Barrierestörung. In den untersuchten Zellen konnten nach TNF-Gabe Veränderungen beobachtet werden, die den bereits in der Literatur beschriebenen irregulären Zellmorphologien ähneln, welche durch wellen- bzw. zick-zack-förmige Veränderungen charakterisiert sind (Ma *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2006) und sich durch den Einsatz des NF- κ B-Inhibitors Curcumin verhindern lassen (Ma *et al.*, 2004). Die Expression einer dominant negativen PKN-Variante führte zu einer Verstärkung dieser Anomalien; dieses war in KA PKN exprimierenden Zellen nicht festzustellen (Abbildung 3-20). Aktives PKN könnte demzufolge mit der nach TNF-Applikation induzierten MLCK-vermittelten Reorganisation des Zytoskeletts interferieren.

Für eine direkte Rolle von PKN in der TNF-Rezeptor/MLCK/MLC-Signalkaskade sprechen auch die Ergebnisse nach Einsatz des spezifischen MLCK-Inhibitorpeptides PIK, denn die

signifikante Verschlechterung des epithelialen Widerstandes nach TNF-Behandlung in DN PKN Zellen konnte durch die Gabe von PIK blockiert werden (Abbildung 3-19A). Dies lässt vermuten, dass PIK an einem späteren Punkt des deregulierten Signalweges eingreift und somit die Barriere-schädigenden Effekte aufhebt. In gleichbehandelten KA PKN exprimierenden Zellen konnte die Beeinträchtigung der Barriere nicht nur verhindert werden, sondern es kam ähnlich wie in der Kontrollgruppe zu einer signifikanten Verbesserung der *tight junction* Funktion nach PIK-Gabe (Abbildung 3-19B). Diese Ergebnisse stimmen mit bereits publizierten Arbeiten überein, in denen eine Verbesserung des transepithelialen elektrischen Widerstandes beim Einsatz von PIK demonstriert werden konnte (Owens *et al.*, 2005; Zolotarevsky *et al.*, 2002).

Neben diesen Veränderungen, die durch Modulation des Aktin-Zytoskeletts kurzfristige Veränderungen der *tight junction* Permeabilität vermitteln, wurden auch Veränderungen in der Expression von Schlüsselkomponenten der epithelialen Barriere untersucht, die mögliche längerfristige Änderungen der Barrierefunktion vermitteln können. Hintergrund hierfür ist unter anderem die Beobachtung, dass eine Aktivierung der MLCK *in vivo* zu konsekutiven Änderungen der Claudin-2 Expression führt und damit neben einer kurzfristigen funktionellen auch eine längerfristige strukturelle Alteration der *tight junction* Funktion vermittelt (Weber *et al.*, 2010). Mitglieder der Claudin-Proteinfamilie sind dafür ein geeigneter Ansatzpunkt, deren Expressionsmuster einen wesentlichen Faktor für die Determinierung der epithelialen Permeabilitäten darstellen (Shen *et al.*, 2011; Van Itallie und Anderson, 2006). So konnte für die Claudine 1 (Furuse *et al.*, 2002), 3 (Milatz *et al.*, 2010), 4 (Van Itallie *et al.*, 2001), 5 (Amasheh *et al.*, 2005) und 8 (Angelow *et al.*, 2006) eine Barriere-abdichtende Funktion nachgewiesen werden, wobei Claudin-8 über die Verdrängung von Claudin-2, einem porenbildenden Claudin (Amasheh *et al.*, 2002), zu einer Verbesserung der *tight junction* Funktion beiträgt (Angelow *et al.*, 2007). In Morbus Crohn Patienten ist die Expression der Claudine 2 (herauf), 5 und 8 (herunter) verändert, was eine Veränderung der *tight junction* Struktur zur Folge hat, die eine wesentliche Rolle für die bekannten Barriestörung unter diesen Bedingungen spielen könnte (Zeissig *et al.*, 2007). Zusätzlich zu diesen Proteinen konnte für Claudin 3 und 4 eine Abnahme der Expression in CED-Patienten demonstriert werden (Prasad *et al.*, 2005).

In dieser Arbeit konnten bis auf die Claudine 7 und 8 keine Veränderungen der für die Barrierefunktion bedeutsamen Claudine beobachtet werden. Einschränkend ist jedoch darauf hinzuweisen, dass das Fehlen solcher Veränderungen zunächst nur im Kontext dieser *in vitro*

Arbeit nachgewiesen werden konnte, was eine potenzielle Rolle von PKN bei der Modulation der Claudin-Expression *in vivo* nicht ausschließt. Dies ist insbesondere daher von Bedeutung, da auch die Aktivierung der MLCK *in vitro* zu keiner Änderung der Claudin-2 Expression führt, während sich diese *in vivo* über eine gesteigerte IL-13 Expression nachweisen lässt (Weber *et al.*, 2010). In Bezug auf Claudin-7 deuten die bislang veröffentlichten Studien auf eine Barriere-unterstützende Funktion hin, da sich in *knockout* Mäusen für dieses Protein eine erhöhte Natrium-, Chlorid- und Kalium-Permeabilität und Anzeichen einer Dehydration zeigten (Tatum *et al.*, 2010). Zusätzlich zu diesen Beobachtungen konnte eine erhöhte Expression der Zytokine TNF, IL-1 β , IL-8 Rezeptor beta, IL-6 und der NF- κ B p65-Untereinheit demonstriert werden, welche mit Störungen der mukosalen Architektur assoziiert waren (Ding *et al.*, 2012). Für Claudin-7 konnte in KA (herauf) und DN PKN (herunter) Zellen eine gegensätzlich regulierte Expression nach der Gabe von TNF gezeigt werden, die das beschriebene Konzept einer Barriere-abdichtenden Funktion von Claudin-7 unterstützen. Da in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht gezielt mit der Expression dieses Proteins interferiert wurde, werden weitere *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen für Schlussfolgerungen bezüglich der funktionellen Relevanz dieses Ergebnis bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen benötigt. Entsprechend lässt sich auch eine mögliche Bedeutung von Claudin-8 anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht abschließend klären. Die Beobachtung einer erhöhten Expression dieses Proteins in DN PKN exprimierenden Zellen befindet sich jedoch im Einklang mit zuvor in dieser Arbeitsgruppe erhobenen Daten, die eine verringerte Claudin-8 Expression in konstitutiv aktives PKN exprimierenden Mäusen demonstrierten (pers. Mitteilung Dr. Fischer).

4.8 Schlussfolgerung und hypothetisches Modell zur Rolle von PKN bei der TNF-induzierten Barrieredysfunktion

Unter Verwendung verschiedener experimenteller Ansätze konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Inhibierung von PKN zu einer Aggravierung der TNF-induzierten Barriestörung auf funktioneller und struktureller Ebene sowie einer verstärkten MLC-Phosphorylierung führt, während die Aktivierung von PKN in einer Abschwächung dieser Effekte resultierte. Diese Ergebnisse stellen somit die ersten Hinweise auf eine potenziell protektive Rolle der RhoA Effektorkinase PKN bei der Regulation der TNF-induzierten

Barrieredysfunktion in intestinalen Epithelzellen dar. Im Folgenden soll anhand der Literatur ein möglicher Mechanismus für diesen Effekt diskutiert werden.

Das Zytokin TNF kann mit dem TNF-Rezeptor 1 und 2 interagieren und differenzielle Effekte auslösen. Sowohl für TNFR1 (Mazzon und Cuzzocrea, 2008) als auch für TNFR2 (Grell *et al.*, 1995) konnte eine Beteiligung an der Regulation von inflammatorischen Signalkaskaden demonstriert werden, jedoch lieferte eine weitere Arbeit Hinweise auf eine essenzielle Bedeutung des TNFR2 bei der TNF-abhängigen Barrierestörung in Caco-2 Zellen (Wang *et al.*, 2006).

Aufgrund dieser Arbeiten wird ein hypothetisches Modell vorgeschlagen, bei dem es im Zuge einer TNFR1-Stimulation zu einer Aktivierung der Caspase-3 kommt, welche konsekutiv zu einer Aktivierung von RhoA führt (Wu *et al.*, 2009). Aktiviertes RhoA bindet dann an die N-terminal gelegene erste ACC Domäne von PKN, wodurch es zu einer Konformationsänderung und damit zur Freilegung der Aktivierungsschleife von PKN kommt (Maesaki *et al.*, 1999; Watanabe *et al.*, 1996), welche in einem nächsten Schritt durch PDK1 phosphoryliert bzw. aktiviert werden kann (Dong *et al.*, 2000; Flynn *et al.*, 2000). Das aktivierte PKN könnte nachfolgend in den TNF-Rezeptor 2-vermittelten Signalweg über die Interaktion mit TRAF1 (Kato *et al.*, 2008) eingreifen. TRAF-Proteine sind als Moleküle definiert, welche Mitglieder der TNF-Rezeptor Superfamilie mit den durch TNF-Liganden induzierten Signalwegen verknüpfen, wobei TRAF1 als einzigem Molekül der TRAF-Familie die für die Aktivierung von NF- κ B- und JNK-Signalwegen wichtige RING-Finger-Domäne fehlt (Ha *et al.*, 2009). Dies bewirkt eine Abschwächung der Barriere-schädigenden Aktivierung von NF- κ B (Ma *et al.*, 2004) und MLCK, der nachfolgenden Phosphorylierung der Myosin Leichtkette sowie der damit verbundenen Kontraktion des Aktin-Zytoskeletts (Wang *et al.*, 2004; Yuhan *et al.*, 1997). Eine graphische Darstellung des vorgeschlagenen Modells ist in Abbildung 4-1 zu sehen.

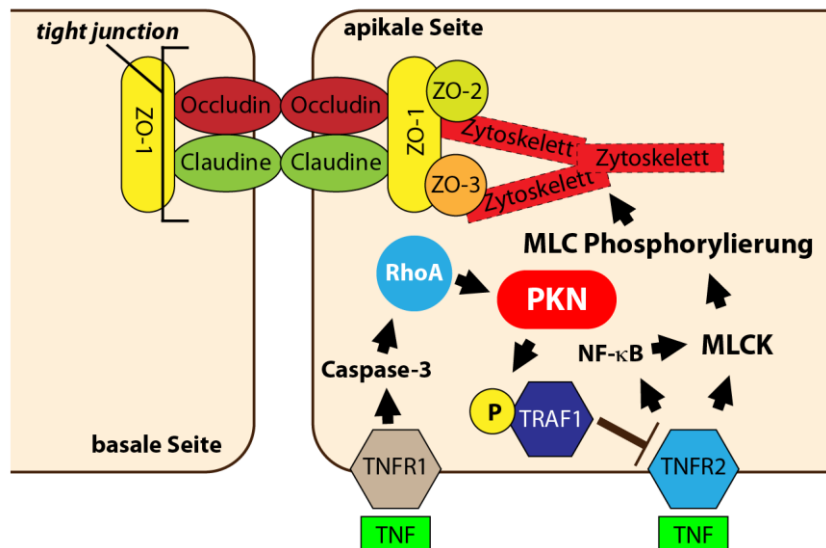


Abbildung 4-1 | Hypothetisches Modell zur Rolle von PKN bei der TNF-induzierten Barrierefunktionsdysfunktion Nach Bindung von TNF an den TNF-Rezeptor 2 (TNFR2) kommt es zur Aktivierung der Myosin Leichtkettenkinase (MLCK) und nachfolgend zur Phosphorylierung der Myosin Leichtkette (MLC), wodurch eine mechanische Kontraktion des Zytoskeletts ausgelöst wird. Diese Kontraktion führt zu einer Öffnung der *tight junctions* und damit zu einer Barrierefunktionsstörung. Ein möglicher Regulationsmechanismus wäre die gleichzeitige Aktivierung des TNF-Rezeptors 1 (TNFR1), welche eine Aktivierung der Caspase-3 zur Folge hat. Die Caspase-3 aktiviert nachfolgend RhoA, welches daraufhin durch Bindung an die N-terminale gelegene erste ACC Domäne eine Aktivierung von PKN bewirkt. Aktiviertes PKN kann nachfolgend den TNF-Rezeptor assoziierten Faktor 1 (TRAF1) phosphorylieren und damit eine Interaktion von TRAF1 mit dem TNFR2 ermöglichen. Daraus resultierend kommt es zu einer Abschwächung der TNFR2-vermittelten Signalwege.

Um eine definitive Aussage bzgl. einer in diesem hypothetischen Modell vermuteten protektiven Rolle von PKN bei der Regulation der TNF-induzierten Barrierefunktionsstörung treffen zu können, müssten weiterführende experimentelle Arbeiten durchgeführt werden.

Ein erster Schritt zur Überprüfung dieses Modells wäre der *in vitro* Nachweis einer vermehrten TRAF1-Phosphorylierung in KA PKN exprimierenden Zellen bzw. einer Verminderung in DN PKN Zellen, was jedoch aufgrund des Fehlens eines spezifischen Phospho-TRAF1-Antikörpers schwierig ist.

Eine alternative Herangehensweise unter Umgehung der Überexpression von dominant negativen oder konstitutiv aktiven PKN-Konstrukten stellt der Einsatz von PKN *knockout* Zellen oder Mäusen dar. Besonders der Einsatz einer PKN *knockout* Maus könnte die *in vivo* Relevanz der in dieser Arbeit erhobenen *in vitro* Daten ermöglichen. In einem nächsten Schritt könnten dann PKN *knockout* Mäuse in einem Colitis-Modell wie z.B. dem Dextran-Natriumsulfat (DSS)-Modell (Wirtz *et al.*, 2007) im Hinblick auf die Auswirkungen auf die intestinale Barrierefunktion untersucht werden.

Einen weiteren Ansatz stellt die Verwendung eines *in vivo* Perfusionsassays dar (Marchiando *et al.*, 2010), bei dem nach intraperitonealer TNF-Applikation das Jejunum einer Maus mit einer PKN-Inhibitor (PRL)-haltigen BSA-Lösung perfundiert und anschließend die Auswirkungen auf den parazellulären BSA-Flux bestimmt werden könnten.

Bei einer Bestätigung der beobachteten Effekte mit Hilfe dieser alternativen Vorgehensweisen ergäbe sich ein neues potenzielles Interventionsziel bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, welches so eine wertvolle Ergänzung der bislang vorhandenen therapeutischen Optionen darstellen könnte.

Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. B. (2003): Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword, *Nat Rev Immunol* (Band 3), Nr. 9, S. 745-56. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12949498>.
- Aijaz, S.; D'Atri, F.; Citi, S.; Balda, M. S. und Matter, K. (2005): Binding of GEF-H1 to the tight junction-associated adaptor cingulin results in inhibition of Rho signaling and G1/S phase transition, *Dev Cell* (Band 8), Nr. 5, S. 777-86. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15866167>.
- Al-Sadi, R.; Boivin, M. und Ma, T. (2009): Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier, *Front Biosci* (Band 14), S. 2765-78. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273235>.
- Amano, M.; Ito, M.; Kimura, K.; Fukata, Y.; Chihara, K.; Nakano, T.; Matsuura, Y. und Kaibuchi, K. (1996): Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase), *Journal of Biological Chemistry* (Band 271), Nr. 34, S. 20246-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8702756>.
- Amasheh, S.; Fromm, M. und Gunzel, D. (2011): Claudins of intestine and nephron - a correlation of molecular tight junction structure and barrier function, *Acta Physiol (Oxf)* (Band 201), Nr. 1, S. 133-40. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20518752>.
- Amasheh, S.; Meiri, N.; Gitter, A. H.; Schoneberg, T.; Mankertz, J.; Schulzke, J. D. und Fromm, M. (2002): Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells, *J Cell Sci* (Band 115), Nr. Pt 24, S. 4969-76. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432083>.
- Amasheh, S.; Schmidt, T.; Mahn, M.; Florian, P.; Mankertz, J.; Tavalali, S.; Gitter, A. H.; Schulzke, J. D. und Fromm, M. (2005): Contribution of claudin-5 to barrier properties in tight junctions of epithelial cells, *Cell Tissue Res* (Band 321), Nr. 1, S. 89-96. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16158492>.
- Angelow, S.; Kim, K. J. und Yu, A. S. (2006): Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells, *J Physiol* (Band 571), Nr. Pt 1, S. 15-26. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322055>.
- Angelow, S.; Schneeberger, E. E. und Yu, A. S. (2007): Claudin-8 expression in renal epithelial cells augments the paracellular barrier by replacing endogenous claudin-2, *J Membr Biol* (Band 215), Nr. 2-3, S. 147-59. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17516019>.
- Aspenstrom, P.; Fransson, A. und Saras, J. (2004): Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system, *Biochemical Journal* (Band 377), Nr. Pt 2, S. 327-37. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14521508>.
- Baert, F. J.; D'Haens, G. R.; Peeters, M.; Hiele, M. I.; Schaible, T. F.; Shealy, D.; Geboes, K. und Rutgeerts, P. J. (1999): Tumor necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis, *Gastroenterology* (Band 116), Nr. 1, S. 22-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9869598>.
- Baeuerle, P. A. und Baltimore, D. (1988): I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor, *Science* (Band 242), Nr. 4878, S. 540-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3140380>.

- Balda, M. S. und Matter, K. (2008): Tight junctions at a glance, *Journal of Cell Science* (Band 121), Nr. 22, S. 3677-3682. In English. URL: <Go to ISI>://000260663500001.
- Baron, U. und Bujard, H. (2000): Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: principles and advances, *Methods Enzymol* (Band 327), S. 401-21. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11044999>.
- Barrett, K. E. (1993): Positive and negative regulation of chloride secretion in T84 cells, *American Journal of Physiology* (Band 265), Nr. 4 Pt 1, S. C859-68. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8238310>.
- Barrios-Rodiles, M.; Brown, K. R.; Ozdamar, B.; Bose, R.; Liu, Z.; Donovan, R. S.; Shinjo, F.; Liu, Y.; Dembowy, J.; Taylor, I. W.; Luga, V.; Przulj, N.; Robinson, M.; Suzuki, H.; Hayashizaki, Y.; Jurisica, I. und Wrana, J. L. (2005): High-throughput mapping of a dynamic signaling network in mammalian cells, *Science* (Band 307), Nr. 5715, S. 1621-5. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761153>.
- Baumgart, D. C. und Carding, S. R. (2007): Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology, *Lancet* (Band 369), Nr. 9573, S. 1627-40. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499605>.
- Baumgart, D. C. und Sandborn, W. J. (2007): Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies, *Lancet* (Band 369), Nr. 9573, S. 1641-57. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499606>.
- Bazzoni, G. (2003): The JAM family of junctional adhesion molecules, *Curr Opin Cell Biol* (Band 15), Nr. 5, S. 525-30. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14519386>.
- Bernards, A. (2003): GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila, *Biochim Biophys Acta* (Band 1603), Nr. 2, S. 47-82. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618308>.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* (Band 7), Nr. 6, S. 1513-23. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/388356>.
- Blair, S. A.; Kane, S. V.; Clayburgh, D. R. und Turner, J. R. (2006): Epithelial myosin light chain kinase expression and activity are upregulated in inflammatory bowel disease, *Laboratory Investigation* (Band 86), Nr. 2, S. 191-201. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16402035>.
- Blikslager, A. T.; Moeser, A. J.; Gookin, J. L.; Jones, S. L. und Odle, J. (2007): Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa, *Physiol Rev* (Band 87), Nr. 2, S. 545-64. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17429041>.
- Bongartz, T.; Sutton, A. J.; Sweeting, M. J.; Buchan, I.; Matteson, E. L. und Montori, V. (2006): Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials, *JAMA* (Band 295), Nr. 19, S. 2275-85. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16705109>.
- Brooks, A. R.; Harkins, R. N.; Wang, P. Y.; Qian, H. S.; Liu, P. X. und Rubanyi, G. M. (2004): Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle, *Journal of Gene Medicine* (Band 6), Nr. 4, S. 395-404. In English. URL: <Go to ISI>://000221134800004.
- Bruewer, M.; Hopkins, A. M.; Hobert, M. E.; Nusrat, A. und Madara, J. L. (2004): RhoA, Rac1, and Cdc42 exert distinct effects on epithelial barrier via selective structural and biochemical modulation of junctional proteins and F-actin, *Am J Physiol Cell Physiol*

- (Band 287), Nr. 2, S. C327-35. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044152>.
- Bruewer, M.; Luegering, A.; Kucharzik, T.; Parkos, C. A.; Madara, J. L.; Hopkins, A. M. und Nusrat, A. (2003): Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms, *J Immunol* (Band 171), Nr. 11, S. 6164-72. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14634132>.
- Bruewer, M.; Samarin, S. und Nusrat, A. (2006): Inflammatory bowel disease and the apical junctional complex, *Ann N Y Acad Sci* (Band 1072), S. 242-52. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17057204>.
- Cereijido, M.; Contreras, R. G.; Shoshani, L.; Flores-Benitez, D. und Larre, I. (2008): Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype, *Biochim Biophys Acta* (Band 1778), Nr. 3, S. 770-93. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18028872>.
- Chaturvedi, L. S.; Marsh, H. M. und Basson, M. D. (2011): Role of RhoA and its effectors ROCK and mDia1 in the modulation of deformation-induced FAK, ERK, p38, and MLC motogenic signals in human Caco-2 intestinal epithelial cells, *Am J Physiol Cell Physiol* (Band 301), Nr. 5, S. C1224-38. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21849669>.
- Chen, G. und Goeddel, D. V. (2002): TNF-R1 signaling: a beautiful pathway, *Science* (Band 296), Nr. 5573, S. 1634-5. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12040173>.
- Clark, C. A.; Thomas, L. K. und Azghani, A. O. (2011): Inhibition of protein kinase C attenuates *Pseudomonas aeruginosa* elastase-induced epithelial barrier disruption, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 45), Nr. 6, S. 1263-71. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21757681>.
- Clayburgh, D. R.; Shen, L. und Turner, J. R. (2004): A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease, *Laboratory Investigation* (Band 84), Nr. 3, S. 282-91. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14767487>.
- Clontech Laboratories, Inc (2005): Tet-Off® and Tet-On® Gene Expression Systems User Manual, http://www.clontech.com/DE/Products/Inducible_Systems/Tetracycline-Inducible_Expression/ibcGetAttachment.jsp?cItemId=17553&fileId=5877756&sitex=10024:22372:US**
- Colegio, O. R.; Van Itallie, C. M.; McCrea, H. J.; Rahner, C. und Anderson, J. M. (2002): Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells, *Am J Physiol Cell Physiol* (Band 283), Nr. 1, S. C142-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055082>.
- Cummins, P. M. (2012): Occludin: one protein, many forms, *Mol Cell Biol* (Band 32), Nr. 2, S. 242-50. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22083955>.
- Cytoskeleton, Inc (2011): G-LISA Assay Manual, <http://www.cytoskeleton.com/activation-assays/galisa-assays>**
- Danese, S. und Fiocchi, C. (2011): Ulcerative colitis, *N Engl J Med* (Band 365), Nr. 18, S. 1713-25. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22047562>.
- Dharmasathaphorn, K.; Mcroberts, J. A.; Mandel, K. G.; Tisdale, L. D. und Masui, H. (1984): A Human Colonic Tumor-Cell Line That Maintains Vectorial Electrolyte Transport, *American Journal of Physiology* (Band 246), Nr. 2, S. G204-G208. In English. URL: <Go to ISI>://A1984SF55900029.

- Ding, L.; Lu, Z.; Foreman, O.; Tatum, R.; Lu, Q.; Renegar, R.; Cao, J. und Chen, Y. H. (2012): Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice, *Gastroenterology* (Band 142), Nr. 2, S. 305-15. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22044670>.
- Dong, L. Q.; Landa, L. R.; Wick, M. J.; Zhu, L.; Mukai, H.; Ono, Y. und Liu, F. (2000): Phosphorylation of protein kinase N by phosphoinositide-dependent protein kinase-1 mediates insulin signals to the actin cytoskeleton, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 97), Nr. 10, S. 5089-94. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792047>.
- Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (2009): Zonula Occludens-1 and-2 Are Cytosolic Scaffolds That Regulate the Assembly of Cellular Junctions, *Molecular Structure and Function of the Tight Junction: From Basic Mechanisms to Clinical Manifestations* (Band 1165), S. 113-120. In English. URL: <Go to ISI>://000267364600016.
- Farhadi, A.; Banan, A.; Fields, J. und Keshavarzian, A. (2003): Intestinal barrier: An interface between health and disease, *Journal of Gastroenterology and Hepatology* (Band 18), Nr. 5, S. 479-497. In English. URL: <Go to ISI>://000182303500002.
- Farquhar, M. G. und Palade, G. E. (1963): Junctional Complexes in Various Epithelia, *Journal of Cell Biology* (Band 17), Nr. 2, S. 375-&. In English. URL: <Go to ISI>://A19634065B00002.
- Fawcett, D. W. (1966): The Cell: An Atlas of Fine Structure, WB Saunders, Philadelphia.
- Fischer, A.; Stuckas, H.; Gluth, M.; Russell, T. D.; Rudolph, M. C.; Beeman, N. E.; Bachmann, S.; Umemura, S.; Ohashi, Y.; Neville, M. C. und Theuring, F. (2007): Impaired tight junction sealing and precocious involution in mammary glands of PKN1 transgenic mice, *J Cell Sci* (Band 120), Nr. Pt 13, S. 2272-83. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17591691>.
- Fish, S. M.; Proujansky, R. und Reenstra, W. W. (1999): Synergistic effects of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha on T84 cell function, *Gut* (Band 45), Nr. 2, S. 191-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403730>.
- Flynn, P.; Mellor, H.; Casamassima, A. und Parker, P. J. (2000): Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase, *Journal of Biological Chemistry* (Band 275), Nr. 15, S. 11064-70. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753910>.
- Fujisawa, K.; Madaule, P.; Ishizaki, T.; Watanabe, G.; Bito, H.; Saito, Y.; Hall, A. und Narumiya, S. (1998): Different regions of Rho determine Rho-selective binding of different classes of Rho target molecules, *Journal of Biological Chemistry* (Band 273), Nr. 30, S. 18943-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9668072>.
- Furuse, M. (2010): Molecular basis of the core structure of tight junctions, *Cold Spring Harb Perspect Biol* (Band 2), Nr. 1, S. a002907. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20182608>.
- Furuse, M.; Fujita, K.; Hiiragi, T.; Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1998): Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin, *Journal of Cell Biology* (Band 141), Nr. 7, S. 1539-1550. In English. URL: <Go to ISI>://000074605300006.
- Furuse, M.; Hata, M.; Furuse, K.; Yoshida, Y.; Haratake, A.; Sugitani, Y.; Noda, T.; Kubo, A. und Tsukita, S. (2002): Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice, *Journal of Cell Biology* (Band 156), Nr. 6, S. 1099-111. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11889141>.

- Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (1993): Occludin - a Novel Integral Membrane-Protein Localizing at Tight Junctions, *Journal of Cell Biology* (Band 123), Nr. 6, S. 1777-1788. In English. URL: <Go to ISI>://A1993MP48900014.
- Furuse, M.; Itoh, M.; Hirase, T.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. und Tsukita, S. (1994): Direct Association of Occludin with Zo-1 and Its Possible Involvement in the Localization of Occludin at Tight Junctions, *Journal of Cell Biology* (Band 127), Nr. 6, S. 1617-1626. In English. URL: <Go to ISI>://A1994PX30800012.
- Furuse, M.; Sasaki, H.; Fujimoto, K. und Tsukita, S. (1998): A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts, *Journal of Cell Biology* (Band 143), Nr. 2, S. 391-401. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9786950>.
- Gabrielli, B.; Wettenhall, R. E.; Kemp, B. E.; Quinn, M. und Bizonova, L. (1984): Phosphorylation of ribosomal protein S6 and a peptide analogue of S6 by a protease-activated kinase isolated from rat liver, *FEBS Lett* (Band 175), Nr. 2, S. 219-26. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6479343>.
- Gao, Q.; Kumar, A.; Srinivasan, S.; Singh, L.; Mukai, H.; Ono, Y.; Wazer, D. E. und Band, V. (2000): PKN binds and phosphorylates human papillomavirus E6 oncoprotein, *Journal of Biological Chemistry* (Band 275), Nr. 20, S. 14824-30. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10809724>.
- Garrett, M. D.; Self, A. J.; van Oers, C. und Hall, A. (1989): Identification of distinct cytoplasmic targets for ras/R-ras and rho regulatory proteins, *Journal of Biological Chemistry* (Band 264), Nr. 1, S. 10-3. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2491843>.
- Garrod, D. und Chidgey, M. (2008): Desmosome structure, composition and function, *Biochim Biophys Acta* (Band 1778), Nr. 3, S. 572-87. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17854763>.
- Gerhard, R.; Schmidt, G.; Hofmann, F. und Aktories, K. (1998): Activation of Rho GTPases by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 increases intestinal permeability in Caco-2 cells, *Infect Immun* (Band 66), Nr. 11, S. 5125-31. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9784513>.
- Gitter, A. H.; Bendfeldt, K.; Schmitz, H.; Schulzke, J. D.; Bentzel, C. J. und Fromm, M. (2000): Epithelial barrier defects in HT-29/B6 colonic cell monolayers induced by tumor necrosis factor-alpha, *Ann N Y Acad Sci* (Band 915), S. 193-203. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11193576>.
- Gotoh, Y.; Oishi, K.; Shibata, H.; Yamagiwa, A.; Isagawa, T.; Nishimura, T.; Goyama, E.; Takahashi, M.; Mukai, H. und Ono, Y. (2004): Protein kinase PKN1 associates with TRAF2 and is involved in TRAF2-NF-kappaB signaling pathway, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 314), Nr. 3, S. 688-94. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14741690>.
- Grell, M.; Douni, E.; Wajant, H.; Lohden, M.; Clauss, M.; Maxeiner, B.; Georgopoulos, S.; Lesslauer, W.; Kollias, G.; Pfizenmaier, K. und Scheurich, P. (1995): The Transmembrane Form of Tumor-Necrosis-Factor Is the Prime Activating Ligand of the 80 Kda Tumor-Necrosis-Factor Receptor, *Cell* (Band 83), Nr. 5, S. 793-802. In English. URL: <Go to ISI>://A1995TH94800016.
- Ha, H.; Han, D. und Choi, Y. (2009): TRAF-mediated TNFR-family signaling, *Curr Protoc Immunol* (Band Chapter 11), S. Unit11 9D. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19918944>.

- Hamaguchi, T.; Ito, M.; Feng, J.; Seko, T.; Koyama, M.; Machida, H.; Takase, K.; Amano, M.; Kaibuchi, K.; Hartshorne, D. J. und Nakano, T. (2000): Phosphorylation of CPI-17, an inhibitor of myosin phosphatase, by protein kinase N, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 274), Nr. 3, S. 825-30. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924361>.
- Haraga, A. und Miller, S. I. (2006): A Salmonella type III secretion effector interacts with the mammalian serine/threonine protein kinase PKN1, *Cell Microbiol* (Band 8), Nr. 5, S. 837-46. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16611232>.
- Harris, T. J. und Tepass, U. (2010): Adherens junctions: from molecules to morphogenesis, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 11), Nr. 7, S. 502-14. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20571587>.
- Haskins, J.; Gu, L. J.; Wittchen, E. S.; Hibbard, J. und Stevenson, B. R. (1998): ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin, *Journal of Cell Biology* (Band 141), Nr. 1, S. 199-208. In English. URL: <Go to ISI>://000073113200017.
- Hayday, A.; Theodoridis, E.; Ramsburg, E. und Shires, J. (2001): Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology, *Nat Immunol* (Band 2), Nr. 11, S. 997-1003. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11685222>.
- He, F.; Peng, J.; Deng, X. L.; Yang, L. F.; Wu, L. W.; Zhang, C. L. und Yin, F. (2011): RhoA and NF-kappaB are involved in lipopolysaccharide-induced brain microvascular cell line hyperpermeability, *Neuroscience* (Band 188), S. 35-47. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21575689>.
- Hermiston, M. L. und Gordon, J. I. (1995): Inflammatory bowel disease and adenomas in mice expressing a dominant negative N-cadherin, *Science* (Band 270), Nr. 5239, S. 1203-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7502046>.
- Hollander, D.; Vadheim, C. M.; Brettholz, E.; Petersen, G. M.; Delahunty, T. und Rotter, J. I. (1986): Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor, *Ann Intern Med* (Band 105), Nr. 6, S. 883-5. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3777713>.
- Hopkins, A. M.; Walsh, S. V.; Verkade, P.; Boquet, P. und Nusrat, A. (2003): Constitutive activation of Rho proteins by CNF-1 influences tight junction structure and epithelial barrier function, *J Cell Sci* (Band 116), Nr. Pt 4, S. 725-42. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12538773>.
- Hsu, C. C.; Li, H. P.; Hung, Y. H.; Leu, Y. W.; Wu, W. H.; Wang, F. S.; Lee, K. D.; Chang, P. J.; Wu, C. S.; Lu, Y. J.; Huang, T. H.; Chang, Y. S. und Hsiao, S. H. (2010): Targeted methylation of CMV and E1A viral promoters, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 402), Nr. 2, S. 228-34. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20933502>.
- Itoh, M.; Furuse, M.; Morita, K.; Kubota, K.; Saitou, M. und Tsukita, S. (1999): Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins, *Journal of Cell Biology* (Band 147), Nr. 6, S. 1351-63. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601346>.
- Itoh, M.; Morita, K. und Tsukita, S. (1999): Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight as well as adherens junctions with a binding affinity to occludin and alpha catenin, *Journal of Biological Chemistry* (Band 274), Nr. 9, S. 5981-5986. In English. URL: <Go to ISI>://000078804400095.
- Ivanov, A. I.; Parkos, C. A. und Nusrat, A. (2010): Cytoskeletal regulation of epithelial barrier function during inflammation, *Am J Pathol* (Band 177), Nr. 2, S. 512-24. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20581053>.

- Jacobson, P. B.; Kuchera, S. L.; Metz, A.; Schachtele, C.; Imre, K. und Schrier, D. J. (1995): Anti-inflammatory properties of Go 6850: a selective inhibitor of protein kinase C, *J Pharmacol Exp Ther* (Band 275), Nr. 2, S. 995-1002. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7473193>.
- Jaffe, A. B. und Hall, A. (2005): Rho GTPases: biochemistry and biology, *Annu Rev Cell Dev Biol* (Band 21), S. 247-69. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212495>.
- Janabi, N.; Mirshahi, A.; Wolfrom, C.; Mirshahi, M. und Tardieu, M. (1996): Effect of interferon gamma and TNF alpha on the differentiation/activation of human glial cells: implication for the TNF alpha receptor 1, *Res Virol* (Band 147), Nr. 2-3, S. 147-53. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901434>.
- Jou, T. S.; Schneeberger, E. E. und Nelson, W. J. (1998): Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases, *Journal of Cell Biology* (Band 142), Nr. 1, S. 101-15. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660866>.
- Jumarie, C. und Malo, C. (1991): Caco-2 cells cultured in serum-free medium as a model for the study of enterocytic differentiation in vitro, *J Cell Physiol* (Band 149), Nr. 1, S. 24-33. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1939345>.
- Kato, T., Jr.; Gotoh, Y.; Hoffmann, A. und Ono, Y. (2008): Negative regulation of constitutive NF-kappaB and JNK signaling by PKN1-mediated phosphorylation of TRAF1, *Genes Cells* (Band 13), Nr. 5, S. 509-20. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429822>.
- Kawamata, T.; Taniguchi, T.; Mukai, H.; Kitagawa, M.; Hashimoto, T.; Maeda, K.; Ono, Y. und Tanaka, C. (1998): A protein kinase, PKN, accumulates in Alzheimer neurofibrillary tangles and associated endoplasmic reticulum-derived vesicles and phosphorylates tau protein, *J Neurosci* (Band 18), Nr. 18, S. 7402-10. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9736660>.
- Kimura, K.; Ito, M.; Amano, M.; Chihara, K.; Fukata, Y.; Nakafuku, M.; Yamamori, B.; Feng, J.; Nakano, T.; Okawa, K.; Iwamatsu, A. und Kaibuchi, K. (1996): Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase), *Science* (Band 273), Nr. 5272, S. 245-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8662509>.
- Krug, S. M.; Fromm, M. und Gunzel, D. (2009): Two-path impedance spectroscopy for measuring paracellular and transcellular epithelial resistance, *Biophys J* (Band 97), Nr. 8, S. 2202-11. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19843452>.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* (Band 227), Nr. 5259, S. 680-5. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>.
- Li, L.; Eto, M.; Lee, M. R.; Morita, F.; Yazawa, M. und Kitazawa, T. (1998): Possible involvement of the novel CPI-17 protein in protein kinase C signal transduction of rabbit arterial smooth muscle, *J Physiol* (Band 508 (Pt 3)), S. 871-81. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9518739>.
- Loftus, E. V., Jr. (2004): Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences, *Gastroenterology* (Band 126), Nr. 6, S. 1504-17. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15168363>.
- Ma, T. Y.; Boivin, M. A.; Ye, D.; Pedram, A. und Said, H. M. (2005): Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (Band 288), Nr. 3, S. G422-30. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15701621>.

- Ma, T. Y.; Iwamoto, G. K.; Hoa, N. T.; Akotia, V.; Pedram, A.; Boivin, M. A. und Said, H. M. (2004): TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (Band 286), Nr. 3, S. G367-76. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14766535>.
- Madara, J. L. und Stafford, J. (1989): Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers, *J Clin Invest* (Band 83), Nr. 2, S. 724-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2492310>.
- Madaule, P. und Axel, R. (1985): A novel ras-related gene family, *Cell* (Band 41), Nr. 1, S. 31-40. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3888408>.
- Maesaki, R.; Ihara, K.; Shimizu, T.; Kuroda, S.; Kaibuchi, K. und Hakoshima, T. (1999): The structural basis of Rho effector recognition revealed by the crystal structure of human RhoA complexed with the effector domain of PKN/PRK1, *Mol Cell* (Band 4), Nr. 5, S. 793-803. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10619026>.
- Marchiando, A. M.; Graham, W. V. und Turner, J. R. (2010): Epithelial barriers in homeostasis and disease, *Annu Rev Pathol* (Band 5), S. 119-44. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20078218>.
- Marchiando, A. M.; Shen, L.; Graham, W. V.; Weber, C. R.; Schwarz, B. T.; Austin, J. R.; Raleigh, D. R.; Guan, Y. F.; Watson, A. J. M.; Montrose, M. H. und Turner, J. R. (2010): Caveolin-1-dependent occludin endocytosis is required for TNF-induced tight junction regulation in vivo, *Journal of Cell Biology* (Band 189), Nr. 1, S. 111-U160. In English. URL: <Go to ISI>://000276336400012.
- Matsumoto, H.; Erickson, R. H.; Gum, J. R.; Yoshioka, M.; Gum, E. und Kim, Y. S. (1990): Biosynthesis of alkaline phosphatase during differentiation of the human colon cancer cell line Caco-2, *Gastroenterology* (Band 98), Nr. 5 Pt 1, S. 1199-207. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2323513>.
- Matter, K. und Balda, M. S. (2003): Signalling to and from tight junctions, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 4), Nr. 3, S. 225-36. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12612641>.
- Mazzon, E. und Cuzzocrea, S. (2008): Role of TNF-alpha in ileum tight junction alteration in mouse model of restraint stress, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (Band 294), Nr. 5, S. G1268-80. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18308862>.
- McCarthy, K. M.; Skare, I. B.; Stankewich, M. C.; Furuse, M.; Tsukita, S.; Rogers, R. A.; Lynch, R. D. und Schneeberger, E. E. (1996): Occludin is a functional component of the tight junction, *J Cell Sci* (Band 109 (Pt 9)), S. 2287-98. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8886979>.
- Meunier, V.; Bourrie, M.; Berger, Y. und Fabre, G. (1995): The human intestinal epithelial cell line Caco-2; pharmacological and pharmacokinetic applications, *Cell Biol Toxicol* (Band 11), Nr. 3-4, S. 187-94. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8564649>.
- Milatz, S.; Krug, S. M.; Rosenthal, R.; Gunzel, D.; Muller, D.; Schulzke, J. D.; Amasheh, S. und Fromm, M. (2010): Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* (Band 1798), Nr. 11, S. 2048-2057. In English. URL: <Go to ISI>://000282412700006.
- Misaki, K.; Mukai, H.; Yoshinaga, C.; Oishi, K.; Isagawa, T.; Takahashi, M.; Ohsumi, K.; Kishimoto, T. und Ono, Y. (2001): PKN delays mitotic timing by inhibition of Cdc25C: possible involvement of PKN in the regulation of cell division, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 98), Nr. 1, S. 125-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11134534>.

- Mukai, H. (2003): The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC, *Journal of Biochemistry* (Band 133), Nr. 1, S. 17-27. In English. URL: <Go to ISI>://000180965100003.
- Mukai, H.; Kitagawa, M.; Shibata, H.; Takanaga, H.; Mori, K.; Shimakawa, M.; Miyahara, M.; Hirao, K. und Ono, Y. (1994): Activation of PKN, a novel 120-kDa protein kinase with leucine zipper-like sequences, by unsaturated fatty acids and by limited proteolysis, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 204), Nr. 1, S. 348-56. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7945381>.
- Mukai, H. und Ono, Y. (1994): A Novel Protein-Kinase with Leucine Zipper-Like Sequences - Its Catalytic Domain Is Highly Homologous to That of Protein-Kinase-C, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Band 199), Nr. 2, S. 897-904. In English. URL: <Go to ISI>://A1994NA91400068.
- Mukai, H. und Ono, Y. (2006): Purification and kinase assay of PKN, *Methods Enzymol* (Band 406), S. 234-50. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16472661>.
- Nusrat, A.; Giry, M.; Turner, J. R.; Colgan, S. P.; Parkos, C. A.; Carnes, D.; Lemichez, E.; Boquet, P. und Madara, J. L. (1995): Rho protein regulates tight junctions and perijunctional actin organization in polarized epithelia, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 23, S. 10629-33. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7479854>.
- Oishi, K.; Mukai, H.; Shibata, H.; Takahashi, M. und Ono, Y. (1999): Identification and characterization of PKNbeta, a novel isoform of protein kinase PKN: expression and arachidonic acid dependency are different from those of PKNalpha, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 261), Nr. 3, S. 808-14. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10441506>.
- Owens, S. E.; Graham, W. V.; Siccardi, D.; Turner, J. R. und Mrsny, R. J. (2005): A strategy to identify stable membrane-permeant peptide inhibitors of myosin light chain kinase, *Pharm Res* (Band 22), Nr. 5, S. 703-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15906163>.
- Peeters, M.; Ghoo, Y.; Maes, B.; Hiele, M.; Geboes, K.; Vantrappen, G. und Rutgeerts, P. (1994): Increased permeability of macroscopically normal small bowel in Crohn's disease, *Dig Dis Sci* (Band 39), Nr. 10, S. 2170-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7924738>.
- Peng, B.; Morrice, N. A.; Groenen, L. C. und Wettenhall, R. E. (1996): Phosphorylation events associated with different states of activation of a hepatic cardiolipin/protease-activated protein kinase. Structural identity to the protein kinase N-type protein kinases, *Journal of Biological Chemistry* (Band 271), Nr. 50, S. 32233-40. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943281>.
- Piontek, J.; Winkler, L.; Wolburg, H.; Muller, S. L.; Zuleger, N.; Piehl, C.; Wiesner, B.; Krause, G. und Blasig, I. E. (2008): Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins, *Faseb Journal* (Band 22), Nr. 1, S. 146-158. In English. URL: <Go to ISI>://000252309900018.
- Podolsky, D. K. (2002): Inflammatory bowel disease, *N Engl J Med* (Band 347), Nr. 6, S. 417-29. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12167685>.
- Popoff, M. R. und Geny, B. (2009): Multifaceted role of Rho, Rac, Cdc42 and Ras in intercellular junctions, lessons from toxins, *Biochim Biophys Acta* (Band 1788), Nr. 4, S. 797-812. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19366594>.
- Prasad, S.; Mingrino, R.; Kaukinen, K.; Hayes, K. L.; Powell, R. M.; MacDonald, T. T. und Collins, J. E. (2005): Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3

- and 4 in colonic epithelial cells, *Laboratory Investigation* (Band 85), Nr. 9, S. 1139-1162. In English. URL: <Go to ISI>://000231301200010.
- Prenzler, A.; Bokemeyer, B.; von der Schulenburg, J. M. und Mittendorf, T. (2011): Health care costs and their predictors of inflammatory bowel diseases in Germany, *European Journal of Health Economics* (Band 12), Nr. 3, S. 273-83. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20967482>.
- Quilliam, L. A.; Lambert, Q. T.; Mickelson-Young, L. A.; Westwick, J. K.; Sparks, A. B.; Kay, B. K.; Jenkins, N. A.; Gilbert, D. J.; Copeland, N. G. und Der, C. J. (1996): Isolation of a NCK-associated kinase, PRK2, an SH3-binding protein and potential effector of Rho protein signaling, *Journal of Biological Chemistry* (Band 271), Nr. 46, S. 28772-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910519>.
- Reinecker, H. C.; Steffen, M.; Witthoeft, T.; Pflueger, I.; Schreiber, S.; MacDermott, R. P. und Raedler, A. (1993): Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease, *Clin Exp Immunol* (Band 94), Nr. 1, S. 174-81. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8403503>.
- Repetto, G.; del Peso, A. und Zurita, J. L. (2008): Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nat Protoc* (Band 3), Nr. 7, S. 1125-31. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18600217>.
- Ridley, A. J. (1997): The GTP-binding protein Rho, *Int J Biochem Cell Biol* (Band 29), Nr. 11, S. 1225-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9451818>.
- Riond, J. L. und Riviere, J. E. (1988): Pharmacology and toxicology of doxycycline, *Vet Hum Toxicol* (Band 30), Nr. 5, S. 431-43. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3055652>.
- Russel, M. G. und Stockbrugger, R. W. (1996): Epidemiology of inflammatory bowel disease: an update, *Scand J Gastroenterol* (Band 31), Nr. 5, S. 417-27. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8734336>.
- Rutgeerts, P.; Sandborn, W. J.; Feagan, B. G.; Reinisch, W.; Olson, A.; Johanns, J.; Travers, S.; Rachmilewitz, D.; Hanauer, S. B.; Lichtenstein, G. R.; de Villiers, W. J.; Present, D.; Sands, B. E. und Colombel, J. F. (2005): Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis, *N Engl J Med* (Band 353), Nr. 23, S. 2462-76. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16339095>.
- Saitou, M.; Fujimoto, K.; Doi, Y.; Itoh, M.; Fujimoto, T.; Furuse, M.; Takano, H.; Noda, T. und Tsukita, S. (1998): Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions, *Journal of Cell Biology* (Band 141), Nr. 2, S. 397-408. In English. URL: <Go to ISI>://000073291000008.
- Saitou, M.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Schulzke, J. D.; Fromm, M.; Takano, H.; Noda, T. und Tsukita, S. (2000): Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands, *Mol Biol Cell* (Band 11), Nr. 12, S. 4131-42. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11102513>.
- Sakurai, H.; Suzuki, S.; Kawasaki, N.; Nakano, H.; Okazaki, T.; Chino, A.; Doi, T. und Saiki, I. (2003): Tumor necrosis factor-alpha-induced IKK phosphorylation of NF-kappaB p65 on serine 536 is mediated through the TRAF2, TRAF5, and TAK1 signaling pathway, *J Biol Chem* (Band 278), Nr. 38, S. 36916-23. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12842894>.
- Sambuy, Y.; Angelis, I.; Ranaldi, G.; Scarino, M. L.; Stammati, A. und Zucco, F. (2005): The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics, *Cell Biology and Toxicology* (Band 21), Nr. 1, S. 1-26. In English. URL: <Go to ISI>://000228876500001.

- Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 74), Nr. 12, S. 5463-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/271968>.
- Sasaki, T. und Takai, Y. (1998): The Rho small G protein family Rho GDI system as a temporal and spatial determinant for cytoskeletal control, *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Band 245), Nr. 3, S. 641-645. In English. URL: <Go to ISI>://000073489500001.
- Schagger, H. (2006): Tricine-SDS-PAGE, *Nat Protoc* (Band 1), Nr. 1, S. 16-22. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406207>.
- Schmidt, A. und Hall, A. (2002): Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch, *Genes Dev* (Band 16), Nr. 13, S. 1587-609. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12101119>.
- Schmitz, H.; Fromm, M.; Bentzel, C. J.; Scholz, P.; Detjen, K.; Mankertz, J.; Bode, H.; Epple, H. J.; Riecken, E. O. und Schulzke, J. D. (1999): Tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) regulates the epithelial barrier in the human intestinal cell line HT-29/B6, *J Cell Sci* (Band 112 (Pt 1)), S. 137-46. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9841910>.
- Schneeberger, E. E. und Lynch, R. D. (2004): The tight junction: a multifunctional complex, *Am J Physiol Cell Physiol* (Band 286), Nr. 6, S. C1213-28. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15151915>.
- Schulzke, J. D.; Ploeger, S.; Amasheh, M.; Fromm, A.; Zeissig, S.; Troeger, H.; Richter, J.; Bojarski, C.; Schumann, M. und Fromm, M. (2009): Epithelial tight junctions in intestinal inflammation, *Ann N Y Acad Sci* (Band 1165), S. 294-300. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538319>.
- Schwartz, M. (2004): Rho signalling at a glance, *Journal of Cell Science* (Band 117), Nr. 23, S. 5457-5458. In English. URL: <Go to ISI>://000225672900001.
- Seasholtz, T. M.; Majumdar, M. und Brown, J. H. (1999): Rho as a mediator of G protein-coupled receptor signaling, *Molecular Pharmacology* (Band 55), Nr. 6, S. 949-956. In English. URL: <Go to ISI>://000080540100001.
- Segain, J. P.; Raingeard de la Bletiere, D.; Sauzeau, V.; Bourreille, A.; Hilaret, G.; Cario-Toumaniantz, C.; Pacaud, P.; Galmiche, J. P. und Loirand, G. (2003): Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis, *Gastroenterology* (Band 124), Nr. 5, S. 1180-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730857>.
- Shaikh, S. und Nicholson, L. F. (2006): Optimization of the Tet-On system for inducible expression of RAGE, *J Biomol Tech* (Band 17), Nr. 4, S. 283-92. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17028168>.
- Shen, L.; Black, E. D.; Witkowski, E. D.; Lencer, W. I.; Guerriero, V.; Schneeberger, E. E. und Turner, J. R. (2006): Myosin light chain phosphorylation regulates barrier function by remodeling tight junction structure, *J Cell Sci* (Band 119), Nr. Pt 10, S. 2095-106. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16638813>.
- Shen, L.; Weber, C. R.; Raleigh, D. R.; Yu, D. und Turner, J. R. (2011): Tight junction pore and leak pathways: a dynamic duo, *Annu Rev Physiol* (Band 73), S. 283-309. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20936941>.
- Shibata, H.; Oda, H.; Mukai, H.; Oishi, K.; Misaki, K.; Ohkubo, H. und Ono, Y. (1999): Interaction of PKN with a neuron-specific basic helix-loop-helix transcription factor, NDRF/NeuroD2, *Brain Res Mol Brain Res* (Band 74), Nr. 1-2, S. 126-34. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640683>.

- Shiga, K.; Takayama, K.; Futaki, S.; Hutti, J. E.; Cantley, L. C.; Ueki, K.; Ono, Y. und Mukai, H. (2010): Development of an intracellularly acting inhibitory peptide selective for PKN, *Biochemical Journal* (Band 425), Nr. 2, S. 445-453. In English. URL: <Go to ISI>://000273772300015.
- Soler, A. P.; Marano, C. W.; Bryans, M.; Miller, R. D.; Garulacan, L. A.; Mauldin, S. K.; Stamato, T. D. und Mullin, J. M. (1999): Activation of NF-kappaB is necessary for the restoration of the barrier function of an epithelium undergoing TNF-alpha-induced apoptosis, *European Journal of Cell Biology* (Band 78), Nr. 1, S. 56-66. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10082424>.
- Standaert, M.; Bandyopadhyay, G.; Galloway, L.; Ono, Y.; Mukai, H. und Farese, R. (1998): Comparative effects of GTPgammaS and insulin on the activation of Rho, phosphatidylinositol 3-kinase, and protein kinase N in rat adipocytes. Relationship to glucose transport, *J Biol Chem* (Band 273), Nr. 13, S. 7470-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516446>.
- Stevenson, B. R.; Siliciano, J. D.; Mooseker, M. S. und Goodenough, D. A. (1986): Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia, *J Cell Biol* (Band 103), Nr. 3, S. 755-66. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3528172>.
- Su, L.; Shen, L.; Clayburgh, D. R.; Nalle, S. C.; Sullivan, E. A.; Meddings, J. B.; Abraham, C. und Turner, J. R. (2009): Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune activation and contributes to development of experimental colitis, *Gastroenterology* (Band 136), Nr. 2, S. 551-63. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027740>.
- Suenaert, P.; Bulteel, V.; Lemmens, L.; Noman, M.; Geypens, B.; Van Assche, G.; Geboes, K.; Ceuppens, J. L. und Rutgeerts, P. (2002): Anti-tumor necrosis factor treatment restores the gut barrier in Crohn's disease, *Am J Gastroenterol* (Band 97), Nr. 8, S. 2000-4. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12190167>.
- Suzuki, T.; Elias, B. C.; Seth, A.; Shen, L.; Turner, J. R.; Giorgianni, F.; Desiderio, D.; Guntaka, R. und Rao, R. (2009): PKC eta regulates occludin phosphorylation and epithelial tight junction integrity, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 106), Nr. 1, S. 61-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114660>.
- Takahashi, M.; Mukai, H.; Toshimori, M.; Miyamoto, M. und Ono, Y. (1998): Proteolytic activation of PKN by caspase-3 or related protease during apoptosis, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 20, S. 11566-71. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751706>.
- Takai, Y.; Sasaki, T. und Matozaki, T. (2001): Small GTP-binding proteins, *Physiol Rev* (Band 81), Nr. 1, S. 153-208. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11152757>.
- Takeuchi, T.; Kosuge, M.; Tadokoro, A.; Sugiura, Y.; Nishi, M.; Kawata, M.; Sakai, N.; Matile, S. und Futaki, S. (2006): Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate, *ACS Chemical Biology* (Band 1), Nr. 5, S. 299-303. In English. URL: <Go to ISI>://000240468700017.
- Tang, Y.; Clayburgh, D. R.; Mittal, N.; Goretsky, T.; Dirisina, R.; Zhang, Z.; Kron, M.; Ivancic, D.; Katzman, R. B.; Grimm, G.; Lee, G.; Fryer, J.; Nusrat, A.; Turner, J. R. und Barrett, T. A. (2010): Epithelial NF-kappaB enhances transmucosal fluid movement by altering tight junction protein composition after T cell activation, *Am J Pathol* (Band 176), Nr. 1, S. 158-67. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008138>.
- Tatum, R.; Zhang, Y.; Salleng, K.; Lu, Z.; Lin, J. J.; Lu, Q.; Jeansonne, B. G.; Ding, L. und Chen, Y. H. (2010): Renal salt wasting and chronic dehydration in claudin-7-deficient

- mice, *Am J Physiol Renal Physiol* (Band 298), Nr. 1, S. F24-34. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19759267>.
- Terry, S. J.; Zihni, C.; Elbediwy, A.; Vitiello, E.; San, I. V. L. C.; Balda, M. S. und Matter, K. (2011): Spatially restricted activation of RhoA signalling at epithelial junctions by p114RhoGEF drives junction formation and morphogenesis, *Nature Cell Biology* (Band 13), Nr. 2, S. 159-U120. In English. URL: <Go to ISI>://000286805900010.
- Terry, S.; Nie, M.; Matter, K. und Balda, M. S. (2010): Rho signaling and tight junction functions, *Physiology (Bethesda)* (Band 25), Nr. 1, S. 16-26. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20134025>.
- Torres, M. I. und Rios, A. (2008): Current view of the immunopathogenesis in inflammatory bowel disease and its implications for therapy, *World J Gastroenterol* (Band 14), Nr. 13, S. 1972-80. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18395894>.
- Totsukawa, G.; Yamakita, Y.; Yamashiro, S.; Hartshorne, D. J.; Sasaki, Y. und Matsumura, F. (2000): Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts, *Journal of Cell Biology* (Band 150), Nr. 4, S. 797-806. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953004>.
- Towbin, H.; Staehelin, T. und Gordon, J. (1979): Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets - Procedure and Some Applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 76), Nr. 9, S. 4350-4354. In English. URL: <Go to ISI>://A1979HM88600044.
- Tsujimoto, M.; Yip, Y. K. und Vilcek, J. (1986): Interferon-gamma enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor, *J Immunol* (Band 136), Nr. 7, S. 2441-4. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3005410>.
- Tsukita, S.; Furuse, M. und Itoh, M. (2001): Multifunctional strands in tight junctions, *Nat Rev Mol Cell Biol* (Band 2), Nr. 4, S. 285-93. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283726>.
- Turksen, K. und Troy, T. C. (2011): Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer, *Biochim Biophys Acta* (Band 1816), Nr. 1, S. 73-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515339>.
- Turner, J. R. (2009): Intestinal mucosal barrier function in health and disease, *Nat Rev Immunol* (Band 9), Nr. 11, S. 799-809. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855405>.
- Turner, J. R.; Rill, B. K.; Carlson, S. L.; Carnes, D.; Kerner, R.; Mrsny, R. J. und Madara, J. L. (1997): Physiological regulation of epithelial tight junctions is associated with myosin light-chain phosphorylation, *American Journal of Physiology-Cell Physiology* (Band 273), Nr. 4, S. C1378-C1385. In English. URL: <Go to ISI>://A1997YB15300032.
- Umeda, K.; Ikenouchi, J.; Katahira-Tayama, S.; Furuse, K.; Sasaki, H.; Nakayama, M.; Matsui, T.; Tsukita, S. und Furuse, M. (2006): ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation, *Cell* (Band 126), Nr. 4, S. 741-54. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923393>.
- Van Assche, G.; Vermeire, S. und Rutgeerts, P. (2007): Adalimumab in Crohn's disease, *Biologics* (Band 1), Nr. 4, S. 355-65. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19707306>.

- Van Itallie, C. M. und Anderson, J. M. (1997): Occludin confers adhesiveness when expressed in fibroblasts, *J Cell Sci* (Band 110 (Pt 9)), S. 1113-21. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9175707>.
- Van Itallie, C. M. und Anderson, J. M. (2004): The molecular physiology of tight junction pores, *Physiology (Bethesda)* (Band 19), S. 331-8. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15546850>.
- Van Itallie, C. M. und Anderson, J. M. (2006): Claudins and epithelial paracellular transport, *Annu Rev Physiol* (Band 68), S. 403-29. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16460278>.
- Van Itallie, C. M.; Holmes, J.; Bridges, A.; Gookin, J. L.; Coccaro, M. R.; Proctor, W.; Colegio, O. R. und Anderson, J. M. (2008): The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2, *J Cell Sci* (Band 121), Nr. Pt 3, S. 298-305. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18198187>.
- Van Itallie, C.; Rahner, C. und Anderson, J. M. (2001): Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability, *J Clin Invest* (Band 107), Nr. 10, S. 1319-27. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11375422>.
- Vandenbroucke, E.; Mehta, D.; Minshall, R. und Malik, A. B. (2008): Regulation of endothelial junctional permeability, *Ann N Y Acad Sci* (Band 1123), S. 134-45. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18375586>.
- Vetrano, S.; Rescigno, M.; Cera, M. R.; Correale, C.; Rumio, C.; Doni, A.; Fantini, M.; Sturm, A.; Borroni, E.; Repici, A.; Locati, M.; Malesci, A.; Dejana, E. und Danese, S. (2008): Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* (Band 135), Nr. 1, S. 173-84. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18514073>.
- Volpe, D. A. (2008): Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays, *J Pharm Sci* (Band 97), Nr. 2, S. 712-25. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17542022>.
- Wajant, H.; Pfizenmaier, K. und Scheurich, P. (2003): Tumor necrosis factor signaling, *Cell Death Differ* (Band 10), Nr. 1, S. 45-65. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12655295>.
- Wajant, Harald und Scheurich, Peter (2011): TNFR1-induced activation of the classical NF- κ B pathway, *The FEBS Journal* (Band 278), Nr. 6, S. 862-876. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21232017>.
- Walsh, S. V.; Hopkins, A. M.; Chen, J.; Narumiya, S.; Parkos, C. A. und Nusrat, A. (2001): Rho kinase regulates tight junction function and is necessary for tight junction assembly in polarized intestinal epithelia, *Gastroenterology* (Band 121), Nr. 3, S. 566-579. In English. URL: <Go to ISI>://000170750800011.
- Wang, F.; Graham, W. V.; Wang, Y.; Witkowski, E. D.; Schwarz, B. T. und Turner, J. R. (2005): Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression, *Am J Pathol* (Band 166), Nr. 2, S. 409-19. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15681825>.
- Wang, F. J.; Schwarz, B. T.; Graham, W. V.; Wang, Y. M.; Su, L. P.; Clayburgh, D. R.; Abraham, C. und Turner, J. R. (2006): IFN-gamma-induced TNFR2 expression is required for TNF-dependent intestinal epithelial barrier dysfunction, *Gastroenterology* (Band 131), Nr. 4, S. 1153-1163. In English. URL: <Go to ISI>://000241246800025.

- Wang, Y.; Zhang, J.; Yi, X. J. und Yu, F. S. (2004): Activation of ERK1/2 MAP kinase pathway induces tight junction disruption in human corneal epithelial cells, *Exp Eye Res* (Band 78), Nr. 1, S. 125-36. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14667834>.
- Watanabe, G.; Saito, Y.; Madaule, P.; Ishizaki, T.; Fujisawa, K.; Morii, N.; Mukai, H.; Ono, Y.; Kakizuka, A. und Narumiya, S. (1996): Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein raphilin as targets of small GTPase Rho, *Science* (Band 271), Nr. 5249, S. 645-648. In English. URL: <Go to ISI>://A1996TT87000045.
- Watson, C. J.; Hoare, C. J.; Garrod, D. R.; Carlson, G. L. und Warhurst, G. (2005): Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores, *J Cell Sci* (Band 118), Nr. Pt 22, S. 5221-30. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16249235>.
- Weber, C. R.; Raleigh, D. R.; Su, L.; Shen, L.; Sullivan, E. A.; Wang, Y. und Turner, J. R. (2010): Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity, *J Biol Chem* (Band 285), Nr. 16, S. 12037-46. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20177070>.
- Weinberg, Jeffrey M. und Buchholz, Robin (2006): TNF-alpha inhibitors, Springer %@ 9783764372484, ISBN: 978-3-7643-7248-4.
- Wilkinson, S. E.; Parker, P. J. und Nixon, J. S. (1993): Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C, *Biochemical Journal* (Band 294 (Pt 2)), S. 335-7. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8373348>.
- Wirtz, S.; Neufert, C.; Weigmann, B. und Neurath, M. F. (2007): Chemically induced mouse models of intestinal inflammation, *Nat Protoc* (Band 2), Nr. 3, S. 541-6. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406617>.
- Wu, X. Y.; Guo, R. Q.; Chen, P. L.; Wang, Q. und Cunningham, P. N. (2009): TNF induces caspase-dependent inflammation in renal endothelial cells through a Rho- and myosin light chain kinase-dependent mechanism, *American Journal of Physiology-Renal Physiology* (Band 297), Nr. 2, S. F316-F326. In English. URL: <Go to ISI>://000268276300010.
- Wyatt, J.; Vogelsang, H.; Hubl, W.; Waldhoer, T. und Lochs, H. (1993): Intestinal permeability and the prediction of relapse in Crohn's disease, *Lancet* (Band 341), Nr. 8858, S. 1437-9. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8099141>.
- Xavier, R. J. und Podolsky, D. K. (2007): Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease, *Nature* (Band 448), Nr. 7152, S. 427-34. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653185>.
- Yoshinaga, C.; Mukai, H.; Toshimori, M.; Miyamoto, M. und Ono, Y. (1999): Mutational analysis of the regulatory mechanism of PKN: the regulatory region of PKN contains an arachidonic acid-sensitive autoinhibitory domain, *J Biochem* (Band 126), Nr. 3, S. 475-84. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10467162>.
- Youakim, A. und Ahdieh, M. (1999): Interferon-gamma decreases barrier function in T84 cells by reducing ZO-1 levels and disrupting apical actin, *Am J Physiol* (Band 276), Nr. 5 Pt 1, S. G1279-88. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330020>.
- Yu, A. S.; Cheng, M. H.; Angelow, S.; Gunzel, D.; Kanzawa, S. A.; Schneeberger, E. E.; Fromm, M. und Coalson, R. D. (2009): Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site, *J Gen Physiol* (Band 133), Nr. 1, S. 111-27. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114638>.

- Yu, H. S.; Cook, T. J. und Sinko, P. J. (1997): Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages, *Pharmaceutical Research* (Band 14), Nr. 6, S. 757-762. In English. URL: <Go to ISI>://A1997XH04100011.
- Yuhan, R.; Koutsouris, A.; Savkovic, S. D. und Hecht, G. (1997): Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability, *Gastroenterology* (Band 113), Nr. 6, S. 1873-82. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9394726>.
- Zeissig, S.; Bojarski, C.; Buegel, N.; Mankertz, J.; Zeitz, M.; Fromm, M. und Schulzke, J. D. (2004): Downregulation of epithelial apoptosis and barrier repair in active Crohn's disease by tumour necrosis factor alpha antibody treatment, *Gut* (Band 53), Nr. 9, S. 1295-302. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15306588>.
- Zeissig, S.; Burgel, N.; Gunzel, D.; Richter, J.; Mankertz, J.; Wahnschaffe, U.; Kroesen, A. J.; Zeitz, M.; Fromm, M. und Schulzke, J. D. (2007): Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease, *Gut* (Band 56), Nr. 1, S. 61-72. In eng. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16822808>.
- Zolotarevsky, Yevgeny; Hecht, Gail; Koutsouris, Athanasia; Gonzalez, Deborah E.; Quan, Cliff; Tom, Jeffrey; Mrsny, Randall J. und Turner, Jerrold R. (2002): A membrane-permeant peptide that inhibits MLC kinase restores barrier function in in vitro models of intestinal disease, *Gastroenterology* (Band 123), Nr. 1, S. 163-172. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12105845>.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström	FADD	<i>FAS-associated death domain</i>
ACC	<i>antiparallel coiled-coil</i>	FBS	<i>fetal bovine serum</i>
Ada	Adalimumab	GAP	<i>GTPase activating proteins</i>
ADP	Adenosindiphosphat	GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
AP1	Aktivatorprotein 1	GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitors</i>
APC	<i>antigen-presenting cell</i>	GDP	Guanosindiphosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat	GEF	<i>gunanine nucleotide exchange factors</i>
ATP	Adenosintriphosphat	GTP	Guanosintriphosphat
Bis I	Bisindolymaleimid I	GUK	<i>guanylate kinase-like</i>
Bp	Basenpaare	HA	<i>Hemagglutinin</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>	HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
Bzgl.	bezüglich	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Bzw.	beziehungsweise	IC ₅₀	<i>inhibitory concentration 50</i>
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen	IF	Immunfluoreszenz
CMV	Cytomegalie-Virus	IFN	Interferon-γ
CNF-1	<i>cytotoxic necrotizing factor 1</i>	IKK	IκB Kinase
CPI-17	<i>protein-kinase C-potentiating myosin phosphatase inhibitor</i>	IL	Interleukin
d.h.	das heißt	IRAK1	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase 1
D-MEM	DULBECCOs modifiziertes EAGLE Medium	JAM	<i>junctional adhesion molecules</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	JNK	JUN N-terminale Kinase
DN	dominant negativ	KA	konstitutiv aktiv
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>	kb	Kilobasen
dox	Doxozyklin	kDa	Kilodalton
DSS	<i>dextran sulfate sodium</i>	LD ₅₀	Letale Dosis 50
DTT	Dithiothreitol	LB	<i>lysogeny broth</i>
EACI	Ethylaminchlorid	MACI	Methylaminchlorid
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MEKK 1	MAP/ERK Kinase Kinase
EDTA	<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>	MDCK	<i>Madin Darby canine kidney</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mk	monoklonal	RING	<i>really interesting new gene</i>

MKK	MAPK Kinase	RLU	<i>relative light units</i>
MLC	Myosin Leichtkette 2	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
MLCK	Myosin Leichtkettenkinase	ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
NaCl	Natriumchlorid	RT	Raumtemperatur
NMDGCl	N-methyl-D-Glucaminchlorid	RT-PCR	<i>reverse transcriptase polymerase chain reaction</i>
OD	Optische Dichte	R _{ij}	Widerstand der <i>tight junction</i>
p	phospho	SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	TAE	Tris-Acetat-EDTA
PAK-1	<i>protease-activated kinase</i>	TBS-(T)	<i>Tris buffered saline</i>
PBS-(T)	<i>phosphat buffered saline</i> (Tween)	TCR	<i>T cell receptor</i>
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase 1</i>	TEACl	Tetraethylammoniumchlorid
PDZ	PSD95/DlgA/ZO-1	TEMED	N,N,N,N'-tetramethylaminomethan
PFA	Paraformaldehyd	TEW	Transepithelialer elektrischer Widerstand
PI-3	Phosphoinositid-3	TGF-β	<i>transforming growth factor β</i>
PIK	<i>membrane-permeant inhibitor of MLCK</i>	T _H 1 und 2	T-Helferzellen 1 und 2
pk	Polyklonal	TLR	<i>Toll-like receptor</i>
PKC	Proteinkinase C	TMACl	Tetramethylammoniumchlorid
PKN	<i>protein kinase novel</i>	TNF	Tumornekrosefaktor α
pNP	p-Nitrophenol	TNFR	TNF-Rezeptor
pNPP	Nitrophenolphosphat	TRADD	<i>TNFR-associated death domain</i>
PRK1	<i>protein kinase C-related kinase 1</i>	TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
PVDF	Polyvinylendifluorid	tTA	Tetrazyklin-kontrollierter Transaktivator
R _a	Widerstand der apikalen Membran	ÜN	über Nacht
R _b	Widerstand der basalen Membran	vgl.	vergleiche
Rho	<i>ras-homologous</i>	WB	Western-Blot
RIP	Rezeptor-interagierendes Protein	z.B.	zum Beispiel
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay	ZO	<i>Zonulae occludentes</i>
R _{ir}	Widerstand des interzellulären Raums	ZONAB	<i>ZO-1-associated nucleic acid binding protein</i>

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1-1 Struktur der intestinalen Barriere.	4
Abbildung 1-2 Struktur von Occludin, Claudin, JAM und ZO-Proteinen.....	6
Abbildung 1-3 Struktur und molekularer Aufbau der <i>tight junctions</i>	8
Abbildung 1-4 Regulation und Funktion der kleinen Rho-GTPase RhoA.	11
Abbildung 1-5 Struktur und Interaktionspartner der RhoA Effektorkinase PKN.	13
Abbildung 1-6 Mechanismen der Zytokin-induzierten Regulation der intestinalen Barrierefunktion.....	15
Abbildung 1-7 TNF-aktivierte Signalwege.....	16
Abbildung 2-1 Vergleich Tricin-SDS-PAGE und SDS-PAGE	38
Abbildung 2-2 <i>Semi-dry</i> -Transfer.	43
Abbildung 2-3 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes von Enterozyten	45
Abbildung 3-1 Validierung der TNF-induzierten Barriestörung	50
Abbildung 3-2 Das im Rahmen der Doktorarbeit verwendete RhoAG14V-pBI-L- Konstrukt	52
Abbildung 3-3 Expressionsvalidierung und -analyse des im Rahmen der Doktorarbeit etablierten RhoA-pBI-L-Konstruktes	53
Abbildung 3-4 Grundcharakterisierung des Induktionsverhaltens des KA RhoA Zellklons	55
Abbildung 3-5 Validierung der Funktionalität der untersuchten RhoAG14V-Mutante	57
Abbildung 3-6 Einfluss von Doxyzyklin bzw. der RhoA-Expression auf den intestinalen Differenzierungsmarker alkalische Phosphatase	58
Abbildung 3-7 Transepitheliale elektrische Widerstände der untersuchten konstitutiv aktiven RhoA-Mutante	59
Abbildung 3-8 Nach KA RhoA-Induktion aktivierte Signalwege.....	60
Abbildung 3-9 Transepitheliale Widerstände nach IFN- und kombinierter IFN/TNF- Behandlung	62

Abbildung 3-10 Aktivierung von PKN nach kombinierter IFN- und TNF-Gabe	63
Abbildung 3-11 Transepitheliale elektrische Widerstände nach gleichzeitiger Gabe von IFN/TNF und PKN-Inhibitoren	65
Abbildung 3-12 Spezifische PKN-Inhibition mittels des Inhibitorpeptides PRL.....	67
Abbildung 3-13 Übersicht über die verwendeten PKN-Konstrukte.....	69
Abbildung 3-14 Expressionsvalidierung und -analyse der im Rahmen der Doktorarbeit etablierten PKN-pBI-L-Konstrukte	70
Abbildung 3-15 Transepitheliale elektrische Widerstände in KA und DN PKN exprimierenden Zellklonen nach kombinierter IFN/TNF-Behandlung.....	71
Abbildung 3-16 Transepitheliale elektrische Widerstände nach Inhibition von PKN mittels Ro 31-8220 und gleichzeitiger Expression von DN oder KA PKN	73
Abbildung 3-17 Ionenpermeabilität in DN PKN und KA PKN exprimierenden Zellen	75
Abbildung 3-18 Charakterisierung der beteiligten Signaltransduktionswege nach IFN/TNF-Behandlung in DN und KA PKN exprimierenden Zellen	77
Abbildung 3-19 MLCK-Inhibition mit Hilfe des Inhibitorpeptides PIK.....	79
Abbildung 3-20 Morphologie von DN und KA PKN Zellen nach IFN/TNF-Gabe	81
Abbildung 3-21 Claudin-Expressionsmuster in DN und KA PKN Zellen nach IFN/TNF-Behandlung	83
Abbildung 4-1 Hypothetisches Modell zur Rolle von PKN bei der TNF-induzierten Barrierefunktion	101
 Tabelle 1-1 Beispiele der klinischen Symptome und der pathologischen Befunde von Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn Patienten	 1
Tabelle 2-1 Verwendete primäre Antikörper	20
Tabelle 2-2 Verwendete sekundäre Antikörper.....	21
Tabelle 2-3 Durchgeführte Einzel-Restriktionsverdau-Ansätze	33
Tabelle 2-4 Durchgeführte Doppel-Restriktionsverdau-Ansätze.....	34
Tabelle 2-5 Verwendeter Ligationsansatz.....	35
Tabelle 2-6 HBSS Basislösung	46

Danksagung

Mein Dank gilt als erstes Herrn Prof. Dr. Franz Theuring für die Bereitstellung des The- mas, für seine Unterstützung und Förderung sowie die vielen wichtigen Ratschläge, die er mir während dieser Arbeit gegeben hat. Desweiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Wolfgang Uckert und Herrn Prof. Dr. Daniel C. Baumgart für die Begutachtung dieser Dissertation. Darüber hinaus möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jerrold R. Turner bedanken, der mich während meines Aufenthaltes an der *University of Chicago, Department of Pathology* in jeder Beziehung unterstützte und mir jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Andreas Fischer für sein persönliches Engagement, seine intensive Betreuung, seinen fachlichen und persönlichen Beistand und seine Ausdauer bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Ohne ihn wäre die Arbeit nicht in ihrer jetzigen Form zustande gekommen. Auch die stete Versorgung mit teilweise gewöhnungsbedürftigen Musikvorschlägen wird mir definitiv in Erinnerung bleiben. Darüber hinaus möchte ich ganz herzlich den Mitgliedern der AG Theuring (Fr. Tanneberger, Karima, Mandy und Anna) für ihre Unterstützung danken. Herausheben möchte ich dabei Frau Cornelia Tanneberger für ihre große Unterstützung bei den kleinen und großen tagtäglichen Hilfen im Laboralltag.

Auch Kristin gebührt ein besonderer Dank, denn sie hat mich durch all die Höhen und Tiefen, welche während der Arbeit durchschritten werden mussten, begleitet und mir dabei stets den Rücken gestärkt. Darüber hinaus hat sie weder Kosten noch Mühen gescheut, um mich bei meinem Aufenthalt in Amerika zu unterstützen, was ich sehr zu schätzen weiß. Ich hoffe, dass ich das in Zukunft zurückzahlen kann.

Der letzte und zugleich größte Dank gilt meiner Mutter und meinem Bruder, die selbstlos immer für mich da waren und sind. Ohne die andauernde Unterstützung meiner Mutter während der vielen Jahre hätte diese Arbeit nicht entstehen können - das werde ich dir niemals vergessen!

Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.

Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten

Andreas Fischer, Heiko Stuckas, Markus Gluth, Tanya D. Russell, Michael C. Rudolph, Neal E. Beerman, Sebastian Bachmann, Shinobu Umemura, Yasuhiro Ohashi, Margaret C. Neville and Franz Theuring; Impaired tight junction sealing and precocious involution in mammary glands of *PKN1* transgenic mice; **Journal of Cell Science**; Volume 120(13) 2272-2283; July 1, 2007

Markus Gluth, Christopher Weber, Hideyuki Mukai, Daniel C. Baumgart, Jerrold R. Turner, Franz Theuring*, Andreas Fischer* (* both authors contributed equally); The RhoA effector kinase PKN1 modulates TNF-induced barrier dysfunction in intestinal epithelial cells; Manuskript in Vorbereitung

Andreas Fischer, Markus Gluth, Ulrich-Frank Pape, Bertram Wiedenmann, Franz Theuring* and Daniel C. Baumgart* (* both authors contributed equally); Adalimumab prevents barrier dysfunction and antagonizes distinct effects of TNF on tight junction protein expression and associated signaling pathways in intestinal epithelial cells; Manuskript in Vorbereitung

Andere Publikationen (veröffentlichte *peer reviewed abstracts*)

Gluth M, Pape UF, Theuring F, Fischer A (2010) RhoA-dependent tight junction regulation is associated with dysregulated Akt and ERK signaling and increased claudin-2 expression. **FASEB J** 24: 1004.9. Abstract

Fischer A, Gluth M, Pape UF, Wiedenmann B, Baumgart DC, Theuring F (2010) Dexamethasone stimulates tight junction sealing in intestinal epithelial cells by up regulating claudin-4 expression via a pathway involving MKP-1 and p38. **Gastroenterology** 138 (5S1): S-83. Abstract

Fischer A, Gluth M, Pape UF, Wiedenmann B, Theuring F, Baumgart DC (2008) Adalimumab prevents TNF α induced barrier disruption in an in vitro model; **Gastroenterology** 134 (4): S-A-646. Abstract

Fischer A, Gluth M, Pape UF, Wiedenmann B, Baumgart DC, Theuring F (2008) Glucocorticoids stimulate tight junction sealing in intestinal epithelial cells by modulating expression of claudin-2 and claudin-4. **Gastroenterology** 134(4):A-118. Abstract

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Untersuchungen zum Einfluss von RhoA und der RhoA Effektorkinase PKN auf
die TNF-induzierte Barrieredysfunktion in humanen intestinalen Epithelzellen

selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel
verwendet habe.

Berlin, den 19.01.2012

Markus Gluth